

**TERAPI PREVENTIF EKSTRAK ETANOL DAUN
TEH HIJAU (*Cameliasinensis folium*) TERHADAP
JUMLAH SEL RADANG DAN TNF- α PULMO
TIKUS (*Rattusnorvegicus*) HASIL
PAPARAN ASAP ROKOK**

SKRIPSI

Oleh:

WAHYU INTAN SEPTIANA

145130101111019



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**TERAPI PREVENTIF EKSTRAK ETANOL DAUN
TEH HIJAU (*Cameliasinensis folium*) TERHADAP
JUMLAH SEL RADANG DAN TNF- α PULMO
TIKUS (*Rattusnorvegicus*) HASIL
PAPARAN ASAP ROKOK**

SKRIPSI

Sebagaisalahsatusyaratuntukmemperolehgelar
SarjanaKedokteranHewan

Oleh:
WAHYU INTAN SEPTIANA
145130101111019



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

TERAPI PREVENTIF EKSTRAK ETANOL DAUN TEH HIJAU (*Cameliasinensis folium*) TERHADAP JUMLAH SEL RADANG DAN TNF- α PULMO TIKUS (*Rattusnorvegicus*) HASIL PAPARAN ASAP ROKOK

Oleh:
WAHYU INTAN SEPTIANA
145130101111019

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada Tanggal 2 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat dalam memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIP. 19580711 199203 2 002

drh. Nurina Titisari, M.Sc
NIP. 19860122 201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : WahyuIntanSeptiana

NIM : 145130101111019

Program Studi: Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

“Terapi Preventif Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (*Camelia Sinensis*

Folium) terhadap Jumlah Sel Radang dan

TNF- α Pulmo Tikus (*Rattus Norvegicus*) Hasil Paparan Asap Rokok”

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isian tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tuliskan terbukti hasiljiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 2 Agustus 2018

Yang menyatakan,

(WahyuIntanSeptiana)

NIM. 145130101111019

**Terapi Preventif Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* folium)
Terhadap Jumlah Sel Radang dan TNF- α Pulmo Tikus (*Rattus norvegicus*)
Hasil Paparan Asap Rokok**

ABSTRAK

Asap rokok merupakan salah satu radikal bebas yang dapat mengganggu kesehatan. Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan jumlah antioksidan yang ada dalam tubuh akan mengakibatkan stress oksidatif. Radikal bebas yang tinggi menyebabkan inflamasi dan kerusakan pada organ pulmo. Hal ini ditandai adanya sel-sel radang dan salivasi sitokin proinflamasi TNF- α . Radikal bebas dapat dihambat dengan antioksidan eksogen yang terkandung dalam ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak teh hijau terhadap penurunan jumlah sel radang dan ekspresi TNF- α pada organ pulmo. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 250 gram yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (tanpa pemberian asap rokok dan ekstrak teh hijau), kontrol positif (yang dipapar asap rokok sebanyak 3 batang/kelompok/hari selama 14 hari tanpa diberikan ekstrak teh hijau), dan kelompok perlakuan (yang diberi ekstrak teh hijau dengan dosis masing-masing kelompok 6,25 mg/250gBB; 9,375 mg/250gBB; dan 12,5 mg/250gBB, dan pemberian asap rokok). Perhitungan sel radang pada histopatologi pulmo secara deskriptif dan pemeriksaan TNF- α menggunakan flow cytometri. Analisa kuantitatif TNF- α menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) ($\alpha=0,05$) dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* test. Hasil pemberian preventif ekstrak teh hijau semakin besar dosis yang diberikan maka dapat menurunkan jumlah sel radang dan ekspresi TNF- α yang lebih besar. Kesimpulan penelitian ini adalah teh hijau (*Camellia sinensis*) mampu menurunkan jumlah sel radang dan menurunkan kadar TNF- α dengan dosis terbaik yaitu 9,375 mg/250gBB.

Kata kunci : Antioksidan, Asap rokok, Sel Radang, Teh Hijau, TNF- α

Preventif Therapy Of Green Tea Leaf (*Camellia sinensis* Folium) Ethanol Extract to Total Cells Inflammatory and TNF- α Pulmo Rats (*Rattus norvegicus*) Results Exposed by Cigarette Smoke

ABSTRACT

Smoke is one of the free radicals that can interfere with health. The imbalance between free radicals and the amount of antioxidants present in the body can cause oxidative stress. High free radicals cause disorders of the pulmo organs and inflammation, which is maintained by inflammatory cells and proinflammatory cytokines TNF- α . Free radicals can be inhibited with exogenous antioxidants contained in green tea (*Camellia sinensis*) extract. This study was intended to determine the effect of green tea extract to decrease of inflammation cell and TNF- α expression in pulmo. This study used male rat (*Rattus norvegicus*) aged 8-12 weeks with body weight average 250 gram and divided into 5 groups of treatment those were negative control, positive control (that was white exposed to 3 cigarette/day for 14 days without green tea extract), and treatment group that was white given green tea extract (with each dose - group 25 mg/kgBB, 37,5 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, then exposed to cigarette). Inflammation cell counts on pulmonary histopathology were descriptive and examination of TNF- α used flow cytometry. The quantitative analysis of TNF- α used an Analysis of Variance (ANOVA) ($\alpha = 0.05$) and followed with Tukey test. Prevention of the green tea extract reduced the number of inflammatory cells and is able to prevent pulsed histopathologic damage. TNF- α expression decreased significantly from the three doses of the green tea extract given. This research showed that green tea (*Camellia sinensis*) extract prevent pulmo histopathologic damage, decrease the number of inflammatory cells, and decrease TNF- α level, with the best dose of 9,375 mg/250 gBB.

Keywords: Antioxidants, Cigarette, Green Tea, Inflammatory Cells, TNF- α

KATA PENGANTAR

PujidansyukurpenulispanjatkankepadaTuhan yang
MahaEsaatasberkatdananugrahNyapenulisdapatmenyelesaikankegiatansertamenyusun
un Proposal Skripsidenganjudul “TerapiPreventifEkstrakEtanolDaunTehHijau
(*CameliaSinensis* *Folium*)terhadapJumlahSelRadangdan
TNF- α PulmoTikus(*RattusNorvegicus*)HasilPaparanAsapRokok”
sebagaisalahsatusyaratpengajuanSkripsi.Proposal inidisusunberdasarkanliteratur
yang penulisperolehdariberbagaireferensi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan
kepada :

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.,Scselaku dosen pembimbing I atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
2. Drh. Nurina Titisari, M.Scselakudosen pembimbing II atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
3. Drh. DodikPrasetyoM.Vet selaku penguji I atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
4. Drh.Ajeng Erika, PH, M.Si. selaku penguji II atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selakuDekanFakultasKedokteranHewanUniversitasBrawijaya.
6. Keluarga tercinta, Ayah, Ibu, Kakak, Nenekyang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan, dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.

7. Keluarga besar AMAZE 2014 A atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi-mimpi yang luar biasa.
8. Keluarga besar AVENGERS 2014 yang telah memberikan semangat dan saran yang membangun.
9. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa proposal Skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap laporan ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Malang, 2 Agustus 2018

Penulis

DAFTAR PUSTAKA

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 LatarBelakang.....	1
1.2 RumusanMasalah	4
1.3 BatasanMasalah.....	5
1.4 TujuanPenelitian.....	6
1.5 ManfaatPenelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 TehHijau.....	7
2.2 Antioksidan.....	13
2.3 Rokok	15
2.4 RadikalBebas.....	18
2.5 Pulmo.....	19
2.6 Inflamasi	22
2.6 Tikus.....	24
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN	27
3.1 KerangkaKonseptual	27
3.2 HipotesisPenelitian.....	31
BAB 4 METODE PENELITIAN	32

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	32
4.2 Sampel Penelitian	32
4.3 Rancangan Penelitian	33
4.4 Variabel Penelitian	34
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	34
4.6 Tahapan Penelitian	35
4.7 Prosedur Penelitian	35
4.7.1 Persiapan Hewan Percobaan	35
4.7.2 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau	36
4.7.3 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Teh Hijau	36
4.7.4 Pemberian Ekstrak Daun Teh Hijau	37
4.7.5 Paparan Asap Rokok	37
4.7.6 Pengambilan Organ Pulmo	37
4.7.7 Pembuatan Preparat Histopatologi dan Perhitungan Sel Radang Pulmo	38
4.7.8 Pembuatan dan Analisis Ekspresi TNF- α	40
4.8 Analisis Data	41
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	42
5.1 Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (<i>Camellia sinensis</i>) terhadap Jumlah Sel Radang pada Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>) hasil Paparan Asap Rokok	42
5.2 Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (<i>Camellia sinensis</i>) terhadap TNF- α pada Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>) hasil Paparan Asap Rokok	49
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

TabelHalaman

2.1 KandunganKatekin.....	9
4.1Rancangankelompokpenelitianini.....	31
5.1 JumlahSelRadangPulmoTikusPadaKelompokPerlakuanPada Lima Lapang Pandang.....	47
5.2 Rata-rata ekspresi Tumor NekrosisFaktor Alfa (TNF- α) padapulmotikuskontrol, tikus yang diberipapaanasaprokok, dantikus yang diberipreventifektrakdauntehhijau (<i>Cameliasinensis</i>).....	49

DAFTAR GAMBAR

GambarHalaman

2.1 Histologi Pulmo 1. Terminal Bronchiole 2. Duktus alveolar	20
2.2 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	23
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	25
5.1.A Histopatologi pulmotikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Kontrol (-) dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x)	42
5.1.B Histopatologi pulmotikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Kontrol (+) dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x dan 400x)	43
5.1.C Histopatologi pulmotikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Preventif 1 dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x dan 400x)	43
5.1.D Histopatologi pulmotikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Preventif 2 dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x dan 400x)	44
5.1.E Histopatologi pulmotikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Preventif 3 dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x dan 400x)	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Hamalan

1. Sertifikat Laik Etik.....	58
2. Hasil rekapitulasi uji DPPH	59
3. Kerangka Operasional.....	60
4. Perhitungan dosis ekstrak daun teh hijau (<i>Camellia sinensis</i> <i>Folium</i>).....	61
5. Metode Pengolahan dan Ekstraksi Teh hijau.....	62
6. Pembuatan preparat Histopatologi.....	64
7. Dokumentasi kegiatan.....	66
8. Data Hasil Jumlah Sel Radang	67
9. Data hasil TNF- α	68
10. Hasil Uji SPSS	69

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

×	: kali
%	: persen
α	: alfa
B	: beta
μg	: mikrogram
μm	: mikrometer
μL	: mikroliter
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
BB	: BeratBadan
BNJ	: Beda NyataJujur
$^{\circ}\text{C}$: derajatCelcius
Ca	: <i>Kalsium</i>
CO	: Karbonmonoksida
CO_2	: Karbondioksida
Cu	: <i>Tembaga</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC	: <i>Epicatechin</i>
ECG	: <i>EpicatechinGallate</i>
EGC	: <i>Epigallocatechin</i>
EGCG	: <i>EpigallocatechinGallate</i>
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
F	: <i>Fluor</i>
Fe^{2+}	: <i>Ferro</i>
g	: gram
gBB	: beratbadan
GC	: <i>Gallocatechin</i>
H&E	: <i>Hematoxylin and Eosin</i>
HCl	: Hidrogenklorida
IC	: <i>Inhibitory Concentration</i>
IU	: International Unit
K	: <i>Kalium</i>
K(+)	: Kelompokpositif
K(-)	: Kelompoknegatif
kg	: kilogram
kgBB	: kilogram beratbadan
LD_{50}	: <i>Lethal Dose 50</i>
mBar	: milibar
MDA	: Malondialdehid
mg	: miligram
mL	: mililiter
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
Mn	: Mangan
nAChRs	: <i>Nicotinic Acetylcholine Receptors</i>
nm	: nanometer
NaCl	: Natriumklorida
Na	: Natrium

NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa-β</i>
NO	: NitritOksida
$^*\text{OH}$: Radikalhidroksil
O_2^{*-}	: Radikalsuperoksida
O_2	: Oksigen
OH^-	: Gugushidroksil
P1	: Kelompokpreventif 1
P2	: Kelompokpreventif 2
P3	: Kelompokpreventif 3
PPOK	: PenyakitPulmoObstruktifKronis
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RAL	: RancanganAcakLengkap
Redoks	: Reduksi-oksidasi
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
ROO^*	: radikalhidroksil
rpm	: rotasi per menit
Se	: Selenium
S/V	: <i>Surface Density</i>
SM	: SebelumMasehi
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SPSS	: <i>Statistical Product and Service Solution</i>
$\text{TNF-}\alpha$: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
Zn	: Seng
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
EPK	: Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di zaman yang modern ini, pencemaran udara merupakan masalah yang sangat penting untuk diatasi. Hal ini disebabkan oleh semakin banyaknya gas beracun buangan dari industri, kendaraan bermotor, dan kegiatan manusia dengan membuang sampah ke atmosfer seperti asap rokok. Selain sebagai pencemaran udara, merokok merupakan salah satu masalah kesehatan pada masyarakat yang ada di dunia, termasuk Indonesia. Asap rokok yang dihirup oleh perokok mengandung komponen gas dan partikel yang berpotensi untuk menimbulkan radikal bebas (Subrandate, dkk., 2015). Dari data World Health Organisation (WHO), di negara berkembang jumlah perokok mengalami peningkatan sebanyak 2,1% setiap tahunnya (Putri, 2015). Jika yang terdata merupakan perokok aktif, perokok pasif yang tidak dapat ditentukan jumlahnya tetap memiliki resiko yang sama. Pada perokok pasif menghisap bahan berbahaya dan asap sampingan 75% dari perokok aktif. Perokok pasif bisa dikategorikan dari berbagai kalangan, seperti anak-anak, bayi, wanita, ibu hamil dan bahkan binatang peliharaan atau binatang liar dilingkungan sekitar. Binatang peliharaan seperti kucing merupakan hewan yang beresiko dapat terkena paparan asap rokok karena sering dijadikan hewan peliharaan. Kucing dengan paparan satu rokok dalam sehari memiliki resiko yang besar untuk terkena karsinoma sel skuamosa mulut (Gerret, *et al.*, 2007). Pada ibu hamil yang terkena paparan asap rokok sebagai perokok pasif ataupun perokok aktif memiliki resiko mendapatkan anak yang lahir prematur 2,5 kali lebih besar dibandingkan ibu hamil yang tidak terpapar asap rokok (Noriani,

dkk., 2015). Rokok juga dapat menyebabkan kenaikan kadar kolestrol dan menyebabkan gangguan pada jantung seperti jantung koroner, dan lain-lain (Malaeny, dkk., 2017).

Rokok memiliki kandungan radikal bebas seperti NO, CO, tar, nikotin, dan lain-lain (Ulilalbab, dkk., 2015). Kandungan berbahaya dari rokok dihisap ke dalam saluran pernafasan kemudian masuk ke dalam pulmo. Reaktivitas ROS akan merusak DNA, protein, dan lipid penyusun sel. Kondisi seperti ini kemudian dapat menyebabkan stres oksidatif. Merokok dapat meningkatkan peroksidasi lipid, menginduksi aktivitas enzim antioksidan sebagai mekanisme mempertahankan diri, dan menghasilkan gangguan keseimbangan yang dinamis antara oksidasi dan antioksidan (Susanti, dkk., 2017).

Secara alami tubuh memiliki antioksidan alami yang memiliki peran sebagai inhibitor yang menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas yang lebih stabil. Asam lemak jenuh merupakan molekul yang paling rentan terhadap radikal bebas, yang dapat menyebabkan gangguan fungsi sel, kerusakan fungsi sel, molekul termodifikasi yang tidak dapat dikenali oleh sel imun, penyakit degeneratif, dan kanker (Musrifah, 2015). Apabila jumlah radikal bebas meningkat, maka antioksidan alami di dalam tubuh tidak akan mampu untuk mengatasinya dan dapat menyebabkan berbagai penyakit (Ulilalbab, dkk., 2015). Radikal bebas yang ada di dalam rokok menyebabkan stres oksidatif yang menyebabkan luka langsung dan mengaktifasi mekanisme molekular yang menginisiasi inflamasi dan pulmo merupakan organ yang memiliki resiko paling tinggi mengalami kerusakan karena asap rokok (Rahimah,

2010). Inflamasi terjadi karena pelepasan berbagai mediator yang berasal dari jaringan rusak, sel mast, leukosit, dan komplemen. Salah satu mediator dari inflamasi tersebut adalah TNF- α yang mengaktifkan dan diproduksi oleh makrofag (Soesilo, 2012). Oleh karena itu untuk melawan radikal bebas dibutuhkan asupan antioksidan dari luar tubuh.

Jumlah antioksidan alami di dalam tubuh yang tidak mencukupi untuk mengatasi radikal bebas, maka membutuhkan antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen dapat berasal dari antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan alami bisa didapatkan dari berbagai makanan seperti teh hijau yang mengandung polifenol katekin. Konsentrasi katekin yang tinggi pada teh dapat dijadikan sumber antioksidan yang baik untuk menangkal radikal bebas (Musarofah, 2015). Diantara berbagai jenis teh yang ada, teh hijau merupakan jenis teh yang memiliki kandungan katekin paling tinggi, yaitu mencapai 10,04% (Anjarsari, 2016). Selain kandungannya, teh hijau juga merupakan minuman yang sudah tidak asing lagi bagi masyarakat, karena produknya yang sudah banyak di pasaran dan mudah untuk mengonsumsinya. Aktivitas antioksidan pada teh hijau diperkirakan efektif untuk menangkal radikal bebas dan mencegah terjadinya stress oksidatif akibat paparan asap rokok. Penurunan radikal bebas mengakibatkan NF- κ B dan fosforilasi I κ B tidak teraktivasi sehingga terjadi penurunan TNF- α oleh makrofag. Penurunan TNF- α dapat menurunkan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan. Dosis ekstrak teh hijau yang diberikan pada penelitian ini bertingkat, yaitu 6,25 mg/250 gBB; 9,375 mg/250 gBB; dan 12,5mg/250 gBB dan dilakukan dalam jangka waktu 21 hari. Hal ini didasarkan pada dosis teh hijau yang pernah

digunakan pada sebuah penelitian mengenai teh hijau, yaitu 100 mg/kg BB yang diberikan dalam jangka waktu 10 hari yang terbukti mampu menghambat kenaikan MDA mencapai 50% (Ojo, *et. al.*, 2006).

Tingginya kandungan antioksidan di dalam teh hijau diperkirakan dapat menurunkan radikal bebas di dalam tubuh. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek preventif teh hijau terhadap penurunan radikal bebas akibat paparan pada tikus yang diukur berdasarkan jumlah sel radang dan ekspresi TNF- α organ pulmo.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana terapi preventif ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap jumlah sel radang pulmo tikus (*Rattus novergicus*) yang diberi paparan asap rokok ?
2. Bagaimana terapi preventif ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap ekspresi TNF- α pulmo tikus (*Rattus novergicus*) yang diberi paparan asap rokok ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian dibatasi pada :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakoterapi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan umur 8-12 minggu dan berat badan

250g. Penggunaan tikus akan mendapatkan persetujuan laik etik dari Komisi etik Universitas Brawijaya.

2. Daun teh hijau(*Camellia sinensis*), yang digunakan diproses tanpa melalui proses fermentasi. Teh hijau (*Camellia sinensis*) yang digunakan berasal dari perkebunan teh daerah Wonosari, Malang. Ekstraksi daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dilakukan dengan cara maserasi menggunakan etanol.
3. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) diberikan selama 21 hari dari hari ke-8 sampai hari ke-28 menggunakan sonde.
4. Dosis preventif ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) yang diberikan yaitu 25mg/kg BB; 37,5mg/kg BB; 50 mg/kg BB, dan disesuaikan terhadap berat badan tikus yaitu 6,25 mg/250 gBB; 9,375 mg/250 gBB; dan 12,5mg/250 gBB.
5. Pemaparan asap rokok dilakukan dengan menggunakan rokok kretek yang mengandung tar sebesar 44,30 mg dan nikotin sebesar 2,90 mg, sebanyak tiga batang/hari/kandang dalam kurun waktu 14 hari. Pemaparan dilakukan di dalam kandang kaca berukuran 37×26×12,5 cm, melalui *smoking pump*.
6. Kandungan fitokimia ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) untuk mengetahui kandungan antioksidan antara lain polifenol, vitamin C, dan vitamin E, yang akan diuji di Laboratorium Kimia Analitik Politeknik Negeri Malang.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui terapi preventif pemberian ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap jumlah sel radang pada pulmo tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diberi paparan asap rokok.
2. Mengetahui terapi preventif pemberian ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap ekspresi TNF- α pulmo tikus putih (*Rattus novergicus*) yang diberi paparan asap rokok.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai salah satu sumber kajian untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap jumlah sel radang dan ekspresi TNF- α pulmo tikus (*Rattus novergicus*) yang diberi paparan asap rokok.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teh Hijau

Tanaman teh berasal dari daratan Cina, provinsi Szechwan. teh dikenal pertama kali pada tahun 2700 SM (Tim Penulis PS, 1993).

Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Sub division : Angiospermae
Class : Dicotyledoneae
Ordo : Guttiferales
Famili : Theaceae
Genus : *Camellia*
Spesies : *Camellia sinensis*

Teh (*Camellia sinensis*) adalah salah satu jenis tanaman yang populer dijadikan sebagai minuman. Tanaman teh terdiri dari dua varietas yaitu *Camellia sinensis* var. *sinensis* dan *Camellia sinensis* var. *assamica*. Kedua varietas ini memiliki ciri-ciri yang berbeda, yaitu pada *Camellia sinensis* var. *sinensis* memiliki ciri-ciri tipe semak dengan daun yang berukuran kecil dan dapat tahan pada cuaca dingin dan kebanyakan ditanam di Cina sebagai bahan baku teh hijau, sedangkan *Camellia sinensis* var. *assamica* memiliki ciri-ciri tipe pohon yang tinggi dengan daun yang berbentuk lebar dan kurang tahan pada cuaca dingin serta merupakan teh yang banyak ditanam di Indonesia (Pitono, dkk., 2013). Selain dijadikan minuman, teh juga banyak dimanfaatkan untuk kosmetik dan

obat-obatan. Berdasarkan cara pegolahannya, teh dibedakan menjadi tiga, yaitu teh hijau, teh olong, dan teh hitam (Sudaryat, dkk., 2015). Teh sebagai bahan minuman dibuat dengan mengambil pucuk daun yang masih muda dan mengalami proses pengolahan, seperti pelayuan, penggilingan, oksidasi enzimatis, dan pengeringan (Towaha dan Balittri, 2013).

Senyawa kimia yang ada di dalam daun teh terdiri dari empat kelompok, yaitu golongan fenol, golongan bukan fenol, aromatis, dan enzim. Golongan fenol terdiri dari katekin, dan flavanol. Golongan bukan fenol terdiri dari karbohidrat, pectin, alkaloid, protein, klorofil, asam organik, resin, dan mineral. Di dalam teh juga terkandung senyawa aromatis yang memberikan aroma pada teh dan enzim-enzim seperti invertase, amylase, β -glukosidase, oksimetilase, protease, dan peroksidase (Towaha dan Balittri, 2013).

Negara Indonesia termasuk eksportir teh pada urutan kelima setelah Sri Lanka, Kenya, Cina, dan India. teh Indonesia dikenal mengandung katekin (antioksidan alami) yang tertinggi di dunia. Di Indonesia, teh hitam merupakan teh yang paling banyak diproduksi, kemudian yang kedua adalah teh hijau. Ditinjau dari sisi kesehatan, maka semakin tinggi kandungan katekin maka semakin bermanfaat bagi kesehatan. Dilihat dari kandungan katekinnya, teh hijau memiliki kandungan katekin paling tinggi dibandingkan dengan teh hitam dan teh olong. Kandungan katekin teh dapat dilihat pada **Tabel 2.1** (Anjarsari, 2016).

Tabel 2.1 Kandungan Katekin Pada Berbagai Jenis Teh (Anjarsari, 2016).

Jenis Teh	Kandungan Katekin Sebelum Pengolahan (%)	Kandungan Katekin Setelah Pengolahan (%)	Katekin Terdegradasi dalam Pengolahan (%)
Teh Olong	13,76	9,49	31,03
Teh Hijau	13,76	10,04	27,03
Teh Hitam	13,76	5,91	57,70

(Anjarsari, 2016)

Katekin adalah kelompok komponen daun teh yang terbesar, terutama komponen daun teh (Anjarsari, 2016). Katekin merupakan senyawa metabolit sekunder yang secara alami ada di dalam tumbuhan dan termasuk ke dalam golongan flavonoid. Katekin memiliki fungsi sebagai antioksidan karena gugus fenol yang ada di dalam katekin. Katekin memiliki dua gugus fenol, yaitu cincin A dan B serta satu gugus dihidropiran, yaitu cincin C. Karena katekin memiliki lebih dari satu gugus fenol, maka sering disebut sebagai senyawa polifenol (Towaha dan Balittri, 2013). Di dalam daun teh, katekin tersintesis melalui empat jalur, yaitu isoprene pathway, polyketide pathway, shikimate pathway, dan amino acid pathway (Anjarsari, 2016).

Sebagian besar polifenol di dalam daun teh terdiri dari epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), dan epigallocatechin gallate (EGCG). Epicatechin dan epigallocatechin berfungsi memunculkan rasa sedikit sepet atau pahit dan manis saat diminum, sedangkan epigallocatechin dan epigallocatechin gallate memunculkan rasa sepet yang kuat. Senyawa-senyawa

katekin dapat bermanfaat dalam menghilangkan bau, sebagai antioksidan, menghambat pertumbuhan jamur, tumor, dan virus (Anjarsari, 2016). Katekin dalam teh memiliki sifat tidak berwarna, larut dalam air, dan membawa sifat pahit, dan sepat pada hasil seduhan teh (Rumiati, 2004).

Epigallocatechin gallate dalam teh hijau menyebabkan apoptosis melalui tahap kondensasi kromatin nukleus, aktivasi enzim caspase-3 yang merupakan protease yang dapat memecah protein yang dapat menyebabkan fragmentasi DNA, dan depolarisasi membran mitokondria sehingga dapat melepaskan sitokrom C ke sitosol. Sitokrom C kemudian akan membentuk ikatan dengan protein sitosol yang dapat mengaktifasi caspase dan menyebabkan apoptosis. Epigallocatechin gallate juga dapat mencegah *cell signaling* sebagai hiperproliferasi sel yang mengalami kerusakan DNA dengan mencegah aktivasi NF- κ B pada sel kanker, mencegah aktivasi protein-1 yang berlebihan, serta mencegah ekspresi epidermal growth factor receptor (EGFR) berlebihan yang dapat menghasilkan fenotip neoplastik pada sel tumor. Epigallocatechin gallate dapat mencegah jalur transduksi insulin-like growth factor yang berfungsi dalam mengaktifasi sintesis DNA dan pembelahan sel sehingga pembelahan sel berhenti. Epigallocatechin gallate juga memiliki fungsi untuk mencegah hiperproliferasi sel dengan cara menghentikan proses pembelahan sel dengan menghambat enzim cyclin-dependent kinase sehingga mengganggu proses G1 sel (Tabaga, dkk., 2015).

Kandungan fenol di dalam teh yaitu flavanol yang terkandung di dalam teh hampir sama dengan katekin tapi berbeda pada tingkat oksidasi inti difenilpropan

primer. Flavanol dalam teh dapat memiliki fungsi sebagai penguat dinding pembuluh darah kapiler dan memacu pengumpulan vitamin C. Flavanol yang ada di dalam daun teh adalah kaempferol, kuarsetin, dan mirisetin dengan kandungan 3-4% dari berat kering (Towaha dan Balittri, 2013).

Golongan bukan fenol teh hijau, yaitu karbohidrat. Karbohidrat yang terkandung di dalam teh hijau adalah 3-5% dari berat kering daun. Karbohidrat ini akan menimbulkan aroma seperti karamel, buah, bunga, madu, dan sebagainya. Kandungan lain yaitu pektin, dengan konsentrasi 4,9-7,6% dari berat kering daun. Pektin di dalam daun teh hijau terurai menjadi asam pektat dan metil alkohol pada saat pengolahan. Metil alkohol yang ada di dalam teh hijau akan bereaksi dengan asam organik menjadi ester dan berperan menyusun aroma. Asam pektat yang berada pada suasana asam akan membentuk gel yang berfungsi mempertahankan bentuk gulungan daun teh setelah digiling dan membentuk lapisan pada permukaan daun dan mengendalikan proses oksidasi. Kemudian teh hijau mengandung alkaloid dengan konsentrasi 3-4% dari berat kering daun. Alkaloid utama pada daun teh hijau adalah kafein, teobromin, dan teofolin yang memberikan sifat menyegarkan di dalam teh hijau (Towaha dan Balittri, 2013).

Teh hijau juga memiliki kandungan protein dan asam-asam amino. Selama proses pelayuan protein diuraikan menjadi asam amino. Asam amino yang berperan dalam pembentukan senyawa aromatis adalah alanin, fenil alanin, valin, leusin, dan isoleusin. Asam amino bersama karbohidrat dan katekin berperan dalam pembentukan aroma pada teh hijau, berupa senyawa hidrokarbon, alkohol,

aldehid, keton, dan ester. Kandungan protrin dalam teh adalah 1,4-5% dari berat kering daun. Kandungan selanjutnya dari teh, yaitu zat warna daun yang berkisar antara 0,019% dari berat kering daun. Kemudian teh hijau juga mengandung asam organik sebesar 0,5-2% dari berat kering daun dan terdiri dari asam malat, asam sitrat, asam suksinat, dan asam oksalat. Pada saat pengolahan, akan bereaksi dengan metil alkohol membentuk senyawa ester yang memiliki aroma yang enak. Kandungan selanjutnya adalah resin sebesar 3% dari berat kering daun. Resin adalah senyawa polimer rantai karbon yang berperan dalam pembentukan aroma dan meningkatkan daya tahan daun terhadap embun beku. Kandungan vitamin dalam daun teh hijau, yaitu vitamin A, B1, B2, B3, B5, E, C dan K. Vitamin di dalam teh hijau tersebut peka terhadap proses oksidasi dan suhu tinggi, sehingga kandungannya lebih tinggi pada teh hijau. Kemudian mineral dalam daun teh hijau berkisar 4-5% dari berat kering daun. Jenis mineral dalam daun teh, yaitu Na, Mg, K, Ca, Zn, Mn, F, Cu, dan Se. Kandungan mineral tertinggi dalam daun teh hijau adalah F yang berperan dalam menguatkan gigi dari karies (Towaha dan Balittri, 2013). Kandungan mineral seperti, tembaga (Cu), seng (Zn), dan mangan (Mn) di dalam teh hijau berperan dalam meningkatkan efektivitas SOD yang sudah ada di dalam tubuh (Astuti, 2008).

Grup hidroksil pada cincin B senyawa flavonoid di dalam teh hijau diketahui dapat mendonorkan ion hidrogen dengan mendonorkan sebuah elektron pada radikal hidroksil (ROO^*) yang didegenerasi menjadi ROOH dan radikal peroksil (OH^*) yang didegenerasi menjadi H_2O , menstabilkan radikal tersebut, dan membentuk radikal flavonoid yang lebih stabil. Senyawa yang dihasilkan dari

regenerasi radikal hidroksil dan radikal peroksil menjadi lebih stabil dan radikal fenoksil yang terbentuk (flavonoid-O^{*}) bersifat kurang reaktif (Astuti, 2008).

Katekin dengan grup hidroksil bebas mampu bereaksi sebagai akseptor radikal bebas dan juga menghambat pembentukan radikal. Katekin memiliki grup hidroksil yang berperan untuk menangkap ion logam. Komponen fenol atau polifenol memiliki sifat sebagai antioksidan primer, yaitu dapat mendonorkan elektron dan mengikat logam (Rohdiana, 2001).

2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat atau memperlambat proses oksidasi (Musarofah, 2015). Antioksidan bekerja dengan cara menerima atau mendonorkan sebuah elektron untuk menghasilkan elektron berpasangan yang lebih stabil. Antioksidan telah ada di dalam tubuh secara alami yang berfungsi untuk menghambat oksidasi dengan bereaksi bersama radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas yang stabil. Apabila radikal bebas di dalam tubuh mengalami peningkatan, maka antioksidan alami ini tidak akan mampu untuk mengatasinya, sehingga tubuh memerlukan suplai antioksidan dari luar tubuh (Ulilalbab, dkk., 2015).

Antioksidan dapat dibedakan menjadi dua, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan sintetis dapat berasal dari hasil sintesis reaksi kimia sedangkan antioksidan alami berasal dari ekstraksi bahan alami. Antioksidan alami dapat berasal dari senyawa antioksidan yang terbentuk saat pengolahan, senyawa antioksidan yang sudah ada di dalam bahan alami, dan senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke dalam

makanan sebagai bahan tambahan pangan. Sebagai contohnya, teh hijau merupakan senyawa antioksidan yang secara alami mengandung antioksidan (Musarofah, 2015).

Mekanisme kerja antioksidan dapat dibedakan menjadi dua jenis, yaitu (Musarofah, 2015) :

1. Antioksidan Primer

Antioksidan primer atau antioksidan enzimatis merupakan antioksidan yang berfungsi mencegah terbentuknya radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas menjadi kurang reaktif karena memiliki kemampuan dapat mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya sebelum sempat bereaksi. Cara kerja antioksidan primer, yaitu dengan memutus reaksi berantai (polimerasi) kemudian diubah menjadi molekul yang lebih stabil. Antioksidan primer di dalam tubuh, yaitu seperti superoksida dimutase (SOD), katalase, dan glutathione peroksidase (GSH-Px).

2. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder atau antioksidan nonenzimatis adalah senyawa yang berfungsi untuk menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Antioksidan ini disebut sebagai sistem pertahanan preventif, dan bekerja dengan menghambat pembentukan senyawa oksigen reaktif dengan cara merusak pada saat pembentukan. Antioksidan sekunder dapat berasal dari sayur dan buah yang mengandung vitamin E, vitamin C, flavonoid, isoflavon, katekin, betakaroten, flavon, antosianin, isokatekin, dan asam lipoat.

3. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier merupakan senyawa yang berperan dalam perbaikan sel dan jaringan yang mengalami kerusakan akibat serangan radikal bebas. Antioksidan tersier memiliki dua fungsi, yaitu sebagai pemberi atom hidrogen dan memperlambat autooksidasi.

Di dalam tubuh, pertahanan antioksidan oleh Superoksida dismutase (SOD) mendegradasi senyawa ROS dengan cara mengkatalisis dismutasi radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot -}$) menjadi H_2O_2 dan O_2 , enzim katalase mendegradasi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 , serta enzim glutathion peroksidase yang mengkatalisis reduksi H_2O_2 menjadi H_2O dengan menggunakan glutathion tereduksi (GSH) dan glutathion teroksidasi (GSSG) sebagai kofaktor (Astuti, 2008).

2.3 Rokok

Rokok merupakan hasil olahan tembakau yang dibungkus termasuk cerutu atau dalam bentuk lain. Rokok dihasilkan oleh tanaman *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, dan spesies lain atau dari bahan sintesis yang mengandung nikotin dan tar dengan atau tanpa bahan tambahan (Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 109 Tahun 2012). Rokok di Indonesia terdiri dari dua jenis, yaitu rokok putih dan rokok kretek. Rokok putih merupakan rokok yang beredar di Indonesia dan diseluruh dunia, akan tetapi rokok kretek adalah rokok yang hanya ada di Indonesia. Rokok putih merupakan rokok dengan filter atau tanpa filter yang menggunakan tembakau yang digulung dengan menggunakan kertas sigaret dan dapat menggunakan bahan tambahan. Rokok kretek merupakan

rokok yang menggunakan cengkeh dan tembakau rajangan yang apabila dibakar akan menimbulkan suara krek-krek. Nikotin Kandungan nikotin pada rokok krek berfilter dipasaran rata-rata adalah 1,10 sampai 2,17 % b/b. kandungan tar berkisar antara 0,05 sampai 0,175% b/b (Kusuma, dkk., 2005).

Rokok mengandung sekitar 4700 komponen kimia dan 200 diantaranya merupakan zat yang berbahaya bagi kesehatan. Komponen kimia dari rokok diantaranya adalah radikal bebas dan oksidan dalam konsentrasi yang tinggi (Rahimah, dkk., 2010). Asap rokok memiliki kandungan radikal bebas seperti NO, CO, NO_x, H₂, O₂, aldehyd, trace elements, dan nitro compounds (Ulilalbab, dkk., 2015). Merokok dapat menyebabkan bermacam-macam gangguan untuk kesehatan, baik untuk perokok itu sendiri ataupun untuk orang lain disekitarnya (Muliarta, dkk., 2009). Asap rokok merupakan radikal bebas yang berasal dari sumber eksogenus, yang memiliki reaktivitas yang tinggi, karena cenderung menarik elektron dari molekul lain yang berpasangan. Radikal bebas bekerja dengan merusak molekul yang memiliki elektron dan ditarik oleh radikal bebas sehingga mengakibatkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel, dan bahkan kematian (Fitria, dkk., 2013).

Racun utama di dalam tembakau yang dapat mengganggu kesehatan diantara adalah nikotin, tar, CO, dan NO (Tirtosastro dan Murdiyati, 2010). Paparan asap rokok memiliki pengaruh yang besar dengan kerusakan DNA yang dipicu oleh adanya stress oksidatif dan karsinogenesis. Elektron tidak berpasangan pada radikal bebas dari asap rokok memiliki elektron tidak erpasangan yang

sangat reaktif sehingga dapat menyerang DNA, protein, dan lipid (Fitria, dkk., 2013).

Kandungan nikotin di dalam rokok memiliki efek yaitu menyebabkan kecanduan. Nikotin masuk ke dalam pulmo kemudian masuk ke dalam darah dan dibawa ke otak. Di dalam otak kemudian terdapat reseptor yang menerima nikotin, kemudian akan membuka jalur yang memungkinkan masuknya ion sodium dan kalsium. Akibat dari banyaknya jumlah kalsium yang masuk di dalam sel saraf maka *neurotransmitter* akan dilepaskan, yang salah satunya adalah dopamin. Dopamin bekerja untuk menstimulasi perasaan bahagia. Apabila kadar nikotin menurun, maka akan muncul perasaan gelisah dan stress. Semakin sering terpapar nikotin, maka kemampuan adaptasi otak semakin meningkat (Fitria, dkk., 2013).

Kandungan lain dari rokok adalah tar atau getah tembakau, adalah campuran beberapa zat hidrokarbon (Nururrahmah, 2014). Tar di dalam rokok dapat menyebabkan noda kuning kecoklatan pada gigi. Tar juga memiliki sifat karsinogenik pemicu penyakit jantung, penyakit darah, impoten, emfisema, bronkitis kronik, gangguan kehamilan, dan lain-lain. Tar mengandung beberapa zat kimia seperti zat arang dan ion besi (Fe^{2+}) yang merupakan zat oksidan. Rokok juga mengandung zat karbon monoksida (CO) yang dapat menetap selama 24 jam sejak rokok dihisap dan mengikuti aliran darah keseluruh tubuh (Diastutik, 2016). Karbon monoksida merupakan gas beracun yang memiliki afinitas kuat dengan hemoglobin sehingga dapat membentuk karboksihemoglobin dari pada membawa oksigen. Apabila sering terpapar oleh asap rokok, maka pulmo akan mengandung

karbon monoksida lebih banyak dibandingkan dengan oksigen, sehingga kadar oksigen dalam darah menjadi berkurang (Nururrahmah, 2014). Akibat dari berkurangnya oksigen dalam darah, maka produksi darah merah meningkat dan kemudian mengalami pengentalan atau hiperkoagulasi (Diastutik, 2016).

Radikal bebas didalam pulmo akan mengoksidasi atom H pada rantai asam lemak tak jenuh pada membran sel sehingga menghasilkan radikan karbon yang kemudian bereaksi dengan oksigen menjadi radikal peroksil. Radikal bebas dapat menyebabkan oksidasi basa nitrogen guanosin. Hal ini menyebabkan guanosin menjadi tidak berikatan dengan *cytosine*, namun membentuk ikatan hydrogen dengan *adenosine* sehingga terjadi mutasi DNA (Fitria, dkk., 2013). Radikal bebas dapat menyerang protein dan menyebabkan hilangnya aktifitas enzimatik (Kumar, dkk., 2004).

2.4 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah salah satu senyawa oksigen reaktif yang secara umum tidak memiliki elektron berpasangan. Radikal bebas dapat muncul dengan adanya pemicu dari berbagai macam faktor. Radikal bebas dapat bermuatan positif (kation), negatif (anion), dan tidak bermuatan. Radikal bebas dapat terbentuk dari komponen makanan yang diubah menjadi energi melalui proses metabolisme, dan juga dapat berasal dari senyawa yang bukan radikal bebas seperti H₂O₂, Ozon, dan lain-lain. Kedua kelompok ini disebut Senyawa Oksigen Reaktif (SOR) atau *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) (Musarofah, 2015). senyawa ROS yang penting dalam kehidupan yaitu radikal bebas dan non radikal. Radikal bebas ROS terdiri dari radikal hidroksil (OH^{*}), radikal superoksida (O₂^{*}), radikal

nitro oksida (NO^*), dan radikal lipid peroksil (LOO^*), serta yang tergolong non radikal yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2), single oksigen ($^1\text{O}_2$), asam hipoklorat (HOCl), dan ozon (O_3) (Astuti, 2008). Secara normal radikal bebas telah ada di dalam tubuh, yang disebut sebagai radikal bebas endogen (Ulilalbab, dkk., 2015). Asap rokok mengandung oksidan yang tinggi dan mampu membentuk senyawa radikal bebas. Senyawa radikal bebas ini kemudian dapat membentuk senyawa radikal bebas. Radikal bebas ini akan menginduksi inflamasi pulmo bagian sentral, perifer, dan parenkim pulmo (Rahmad, dkk., 2015).

Radikal bebas sering dianggap sebagai oksidan, hal ini karena memiliki sifat yang sama, yaitu agresivitas untuk menarik elektron yang ada disekitar. Akan tetapi, tidak semua oksidan merupakan radikal bebas. Radikal bebas memiliki bahaya yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa oksidan non-radikal. Hal ini karena tingginya reaktivitas dari radikal bebas dalam mencari pasangan elektron mengakibatkan terbentuknya senyawa radikal bebas yang baru. Apabila senyawa radikal bebas bertemu dengan molekul lain maka akan terbentuk senyawa radikal bebas yang baru, dan seterusnya akan terjadi reaksi berantai. Radikal bebas akan terus terbentuk sampai ada antiosidan yang meredamnya (Musarofah, 2015).

Radikal bebas yang berikatan dengan radikal bebas lain maka elektron-elektron yang tidak berpasangan dari senyawa tersebut akan bergabung dan membentuk ikatan kovalen yang stabil. Namun, apabila radikal bebas bertemu dengan senyawa yang bukan radikal bebas maka akan terjadi tiga kemungkinan, yaitu radikal bebas akan memberikan elektron tidak berpasangannya kepada

senyawa yang bukan radikal bebas, radikal bebas akan menerima elektron dari senyawa yang bukan radikal bebas, atau radikal bebas akan bergabung dengan senyawa yang bukan radikal bebas tersebut (Musarofah, 2015).

Pembentukan radikal bebas

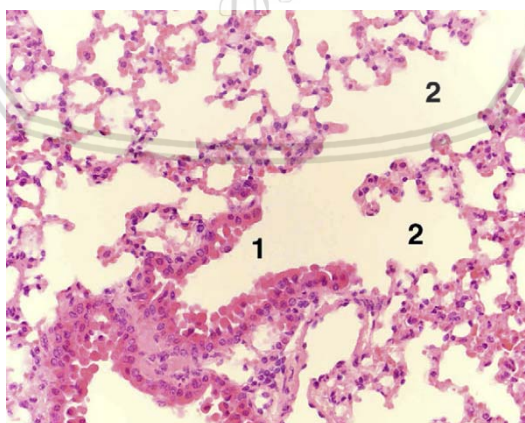
1. Tahap inisiasi atau awal pembentukan
2. Tahap propagasi atau pemanjangan rantai
3. Tahap terminasi atau bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal

2.5 Pulmo

Pada sistem pernafasan, pulmo terdiri dari pulmo kiri dan kanan. Pulmo kiri terdiri dari lobus tunggal dan pulmo kanan yang terdiri dari lobus kranial, aksesorius, dan caudal. Pulmo terdiri dari bronchus yang dimiliki pada masing-masing pulmo dexter dan pulmo sinister. Pulmo terletak di rongga thoraks, tertutup dan dikelilingi oleh pleura. Bronchus bercabang secara berurutan menjadi bronchus primer, bronchus sekunder, bronchus tersier, dan bronchiolus. Bronchiolus terus bercabang menjadi *terminal bronchiolus* yang tidak memiliki bentukan alveolus. *Respiratory bronchiolus* merupakan akhir percabangan dari bronchiolus dan memiliki potongan terluar alveolus dan percabangan *alveolar duct*. Pada bagian *alveolar duct* memiliki *alveolar sac*. *Alveolar sac* merupakan bentukan dari gabungan beberapa alveolus. Pada alveolus terjadi pertukaran gas (O_2 dan CO_2). Oksigen (O_2) berdifusi ke dalam darah di kapiler alveolar dan berikatan dengan hemoglobin eritrosit. Karbon dioksida (CO_2) berdifusi dari

plasma di membran alveolar ke alveolus dan mendorong keluar udara tersebut (Romich, 2009).

Pada gambaran histologi pulmo, saluran udara yang besar dilapisi oleh sel epitel kolumnar, sel bersilia, dan beberapa sel neuroendokrin, sek mukosa dan sel *brush*. Setiap bronkus ekstrapulmoner memasuki pulmo sebagai bronkus primer intrapulmoner (mesobronkus). Bronkus sekunder berasal dari bronkus primer dan cabang ke parabronchi (bronkus tersier) pada pulmo. Bronkus primer dilapisi oleh epitel kolumnar dengan kelenjar mukosa dan sel goblet. Bronkus sekunder dilapisi oleh epitel kolumnar bersilia dengan sel mukosa, dan parabronchi dilapisi oleh epitel kuboid (Bacha *et.al.*, 2012). Saluran nafas terkecil pulmo, yaitu terminal bronchiol yang merupakan saluran ke alveolar. Saluran alveolar terdiri dari kantung alveolar dan alveoli. Saluran alveolar terdiri dari sel tipe satu yang terdiri dari epitel skuamus tipis dan epitel tipe dua yang kuboid (Hendrich, 2012). Gambaran histologi dari pulmo dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar. 2.1 Histologi Pulmo (Hendrich, 2012).

Keterangan : 1. Terminal Bronchiole
2. Duktus alveolar

Pulmo adalah organ internal yang memiliki fungsi sebagai pertukaran gas antara oksigen dan karbondioksida. Oksigen dari lingkungan dibawa oleh aliran udara dan dibawa ke dalam alveoli, kemudian berdifusi ke dalam membran kapiler alveoli dan oksigen masuk ke dalam jaringan kapiler ke dalam darah. Karbondioksida adalah sisa metabolisme yang dikeluarkan dari darah ke jaringan, kemudian dilepas ke lingkungan. Apabila organ pulmo mengalami gangguan, maka metabolisme di dalam tubuh akan terganggu. Paparan asap rokok yang masuk ke dalam pulmo secara terus-menerus akan merugikan (Rahmad, dkk., 2015).

Setelah udara masuk ke dalam pulmo dari alveolus, oksigen masuk ke kapiler darah secara difusi. Hemoglobin kemudian mengikat oksigen menjadi oksihemoglobin, kemudian mengedarkannya ke seluruh jaringan tubuh dan ke seluruh sel tubuh. Proses oksidasi sel menghasilkan karbon dioksida, yang akan diangkut oleh darah dan dibawa ke pulmo. Karbon dioksida kemudian akan masuk ke dalam alveolus secara difusi dan dikeluarkan saat menghembuskan nafas (Mikrajuddin, dkk., 2007). Organ pulmo adalah organ yang memiliki resiko paling tinggi untuk mengalami kerusakan akibat paparan asap rokok. Hal ini diakibatkan pulmo selalu terpapar bahan polutan secara terus-menerus (Rahimah, 2010).

Asap rokok dapat menyebabkan stres oksidatif pada makromolekul tubuh seperti lipid dan protein yang mengubah morfologi sel. Sel pulmo yang terpapar asap rokok mengalami perubahan patologis, yaitu pelebaran dinding alveolus. Pelebaran pada dinding alveolus diawali oksidasi protein yang mengakibatkan

ketidakseimbangan enzim proteolisis dan anti-proteolisis pada pulmo sehingga kehilangan integritas dan kemampuan elastisitasnya. Perubahan yang terjadi pada sel pulmo dapat menimbulkan berbagai penyakit obstruktif dan penyakit interstitial (Rahimah, dkk., 2010). Fitria (2013) menyebutkan bahwa asap rokok akan menginduksi sel inflamatori untuk melepaskan enzim elastase yang kemudian akan memecah elastin yang ada pada dinding alveoli. Oksidan di dalam asap rokok menginaktivasi enzim alfa-antitripsin yang memiliki peran dalam menghambat kerja enzim elastase. Proses ini kemudian dapat menyebabkan kerusakan pada dinding alveoli yang bersifat kronik.

2.6 Inflamasi

Inflamasi adalah respon atau reaksi fisiologis jaringan terhadap infeksi atau cedera dan melibatkan lebih banyak mediator dibanding dengan respon imun. Inflamasi dapat terjadi secara lokal, sistemik, akut, dan kronis, yang menimbulkan kelainan patologis. Sel-sel imun non spesifik seperti neutrofil, sel mast, basofil, eosinofil, dan makrofag jaringan berperan dalam proses inflamasi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014). Dalam inflamasi diperlukan sitokin, yaitu berperan untuk mengawali, mempengaruhi, dan meningkatkan respon imun nonspesifik. Sitokin adalah glikoprotein yang berasal dari sel T helper, sel natural killer (NK), dan makrofag. Sel T helper terdiri dari dua yang dapat menghasilkan sitokin perbedaan fungsi imun efektor dan dapat bereaksi satu sama lain (Darlina, dkk., 2015). Sel T helper tipe 1 menghasilkan IFN- γ (Interferon gama), IL-2 (Interleukin-2), dan TNF- α (Tumor necrosis factor alfa). Sitokin ini berperan dalam mengaktifkan makrofag dalam membentuk sitokin proinflamasi seperti IL-

1, IL-6, TNF- α , serta menginduksi mekanisme imun efektor sitotoksik dari makrofag. Kemudian sel T helper 2 menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13, yang memiliki fungsi dalam menginduksi pembentukan antibodi dan menghambat fungsi makrofag, disebut juga sitokin anti inflamasi (Irawati, 2014).

TNF- α (Tumor Necrosis Factor) adalah sitokin atau mediator primer pada proses inflamasi yang dihasilkan oleh sel limfosit yang berfungsi sebagai isyarat antara sel-sel dalam membentuk jaringan komunikasi dalam respon imun. TNF- α dapat mempengaruhi pertumbuhan, mobilitas, dan diferensiasi leukosit jenis-jenis lain (Darlina, dkk., 2015). Memiliki efek biologis sebagai pengerah neutrofil dan monosit ketempat yang mengalami kerusakan dan mengaktifkan sel-sel tersebut. Fungsi lain yaitu merangsang makrofag untuk mensekresikan dan menginduksi kemotaksis dan pengerahan leukosit pada daerah yang mengalami luka (Irawati, 2014).

2.7 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Klasifikasi Tikus putih (*Rattus norvegicus*), yaitu (Suckow, 2012) :

Kingdom : Animal
Phylum : Chordata
Subphylum : Vertebrata
Class : Mammalia
Order : Rodentia
Suborder : Mymorpha
Family : Muridae
Genus : Rattus

Species : *Rattus norvegicus*



Gambar. 2.2 Tikus (*Rattus norvegicus*) (Liu et al., 2017).

Tikus putih dewasa memiliki panjang tubuh 18-20 cm. Berat badan tikus jantan dewasa dapat mencapai 300-600 g, dan berat badan betina mencapai 250-500 g. Tikus memiliki masa hidup selama 2,5-3 tahun. Ekor tikus ditutupi dengan rambut pendek. Kulit tikus tidak memiliki kelenjar keringat, dan kelenjar keringat hanya dapat ditemukan pada cakar. Dalam kondisi panas, tikus melakukan penurunan suhu tubuh melalui ekor. Dari anatomi tubuh, tikus memiliki tulang rangka yaitu tengkorak, vertebrae, sternum, tulang rusuk, ekstremitas caranial, dan ekstremitas cranial. Tikus memiliki dua gigi seri dan enam geraham dimaxila dan mandibula. Formula gigi tikus yaitu 2 (incisor 1/1, caninus 0/0, premolar 0/0, dan molar 3/3) yang berjumlah 16 gigi. Gigi seri dari tikus selalu tumbuh selama tikus hidup (Liu *et al.*, 2017).

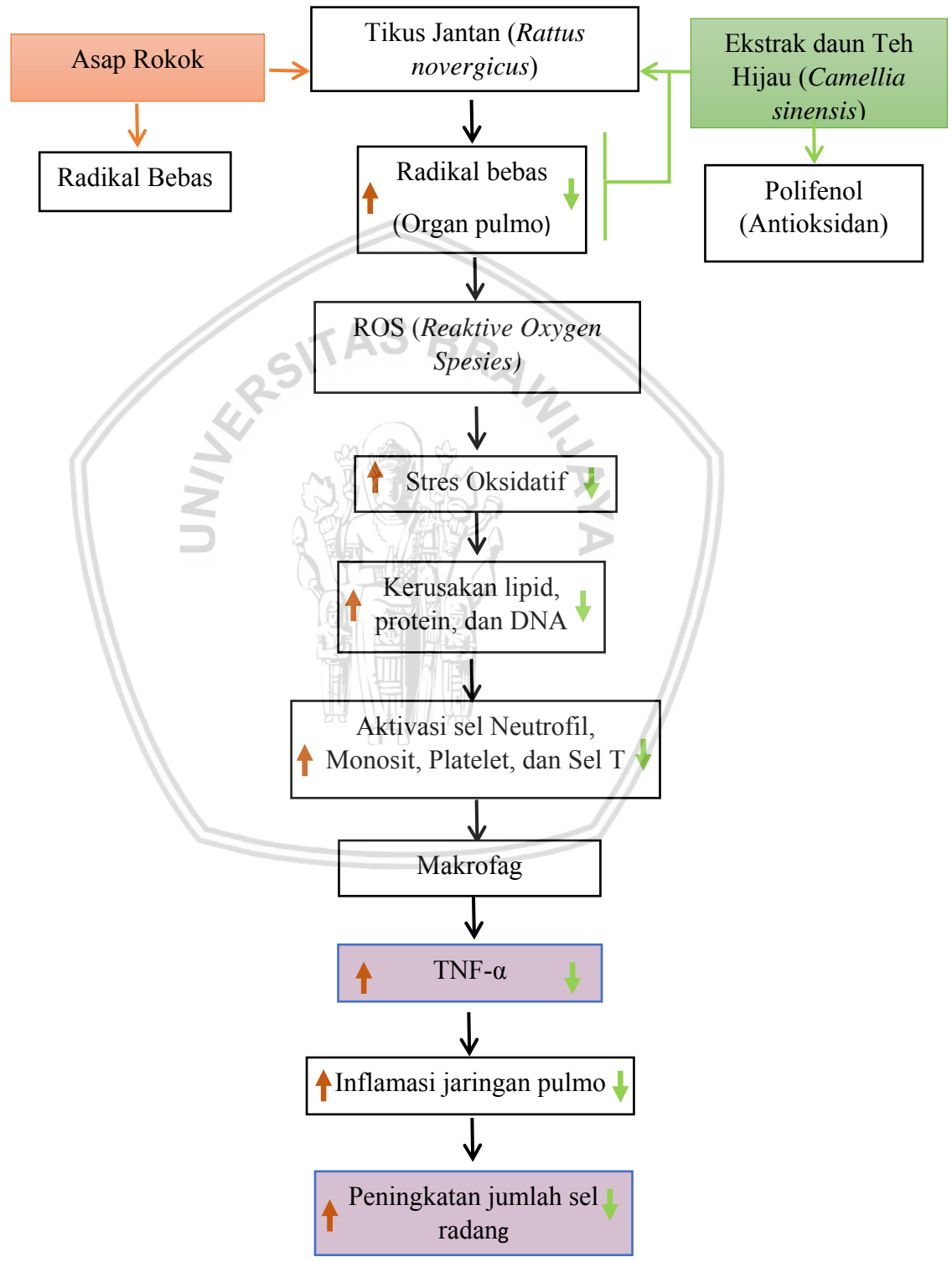
Sistem pencernaan tikus sedikit berbeda dengan hewan lain, yaitu tikus tidak dapat muntah. Perut tikus dibagi menjadi dua bagian, yaitu bagian perut atau jantung yang mana merupakan nonglandular, dan bagian korpus atau pilorus yang bersifat kelenjar. Terdapat sebuah bagian yang memisahkan dua bagian dengan kerongkongan yang masuk kelekukan lambung yang lebih kecil melalui bagian

dari lipatan. Lipatan inilah yang membuat tikus tidak dapat muntah. Hati tikus terdiri dari empat lobus, yaitu yang pertama median, yang memiliki celah yang dalam untuk ligamentum hati, kedua, yaitu right lateral yang terbagi sebagian, ketiga, yaitu bagian kiri yang besar, dan keempat, yaitu kaudatus yang berukuran kecil dan mengelilingi kerongkongan. Selain tidak dapat muntah, tikus juga tidak memiliki kantong empedu dan saluran empedu dari setiap lobus membentuk saluran empedu yang umum, yang memasuki duodenum sekitar 25 mm dari spinger pilorus (Liu *et al.*, 2017).







Pada sistem pernafasan tikus, pulmo terdiri dari pulmo kiri dan kanan. pulmo kiri terdiri dari lobus tunggal dan pulmo kanan yang terdiri dari lobus kranial, aksesorius, dan caudal. Tikus tidak memiliki suplai saraf adrenergik ke otot bronchial dan bronkokonstriksi dikendalikan oleh vagal tone. Trakhea terletak di bagian ventral dari esofagus dan umumnya terdiri dari 24 cincin kartilago yang berbentuk "U" (Liu *et al.*, 2017).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar. 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

-  : Pengaruh paparan asap rokok
-  : Pengaruh ekstrak teh hijau
-  : Menghambat efek negatif asap rokok
-  : Bahan preventif
-  : Induksi asap rokok
-  : Efek yang diamati

Pemberian paparan asap rokok pada hewan coba tikus putih diberikan tiga batang per hari selama 14 hari pada pagi hari dari hari ke-15 sampai hari ke-28. Asap rokok akan direspirasi oleh tikus putih di dalam *smoking chamber* yang dilengkapi dengan ventilasi udara dan tempat pembakaran rokok. Hewan coba tikus putih dalam penelitian diposisikan sebagai perokok pasif yang terpapar asap rokok pada saat tidak dihisap (*sidestream*). Pemaparan asap rokok selama 14 hari dengan menggunakan tiga batang rokok setiap kali pemaparan bersifat akut. Nilai LD₅₀ nikotin dalam rokok untuk tikus yakni 50 mg/kgBB.

Rokok yang digunakan sebagai paparan merupakan jenis rokok kretek tanpa filter. Asap rokok yang mengandung radikal bebas yang salah satunya adalah nitrit oksida (NO) dengan reaktivitas yang rendah. NO dan superoksida (O₂⁻) bereaksi dan memproduksi peroksinitrit (ONOO⁻) yang merupakan radikal dengan reaktivitas tinggi. Tar di dalam asap rokok juga mengandung Fe yang merupakan stimulator yang kuat dalam pembentukan ROS. Fe²⁺ dapat bereaksi dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) yang memiliki aktifitas lemah, kemudian bereaksi dan menjadi radikal hidroksil (OH^{*}) yang reaktif.

Asap rokok yang memproduksi ROS dalam jumlah tinggi dapat mengaktifasi signal intraseluler pada sel endotel dan memicu pelepasan sitokin pro inflamasi yang mengakibatkan inflamasi. Inflamasi terjadi karena pelepasan berbagai mediator yang berasal dari jaringan rusak, sel mast, leukosit, dan komplemen. Salah satu mediator dari inflamasi tersebut adalah TNF- α yang mengaktifkan dan diproduksi oleh makrofag. TNF- α adalah salah satu sitokin pro inflamasi yang menyebabkan inflamasi akut akibat paparan asap rokok. Asap rokok dapat mengaktifasi makrofag dan menginduksi pelepasan TNF- α melalui jalur ERK. Extracellular signal regulated kinase (ERK) atau classis MAPK adalah molekul yang memediasi pembentukan protease dan sitokin apabila mendapat rangsangan seperti asap rokok sehingga terjadi inflamasi. Kemudian TNF- α akan mengerahkan dan mengaktifkan neutrofil dan monosit ketempat terjadinya inflamasi.

Teh hijau (*Camellia sinensis*) memiliki berbagai kandungan antioksidan, dengan kandungan utama polifenol yaitu katekin, memiliki efek antioksidan yang sangat baik. Katekin yang terkandung dalam teh hijau dapat menyebabkan apoptosis dan menghentikan siklus sel pada sel yang telah mengalami kerusakan DNA seperti sel kanker serta mencegah *cell signaling* untuk hiperproliferasi sel. Kandungan mineral seperti, tembaga (Cu), seng (Zn), dan mangan (Mn) di dalam teh hijau berperan dalam meningkatkan efektivitas antioksidan endogen yang sudah ada di dalam tubuh.

Di dalam tubuh, pertahanan antioksidan oleh Superoksida dismutase (SOD) mendegradasi senyawa ROS dengan cara mengkatalisis dismutasi radikal

anion superoksida (O_2^*) menjadi H_2O_2 dan O_2^- , enzim katalase mendegradasi H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 , serta enzim glutathion peroksidase yang mengkatalisis reduksi H_2O_2 menjadi H_2O dengan menggunakan glutathion tereduksi (GSH) dan glutathion teroksidasi (GSSG) sebagai kofaktor.

Grup hidroksil pada cincin B senyawa flavonoid di dalam teh hijau diketahui dapat mendonorkan ion hidrogen dengan mendonorkan sebuah elektron pada radikal hidroksil (ROO^*) yang didegenerasi menjadi ROOH dan radikal peroksil (OH^*) yang didegenerasi menjadi H_2O , menstabilkan radikal tersebut, dan membentuk radikal flavonoid yang lebih stabil. Senyawa yang dihasilkan dari regenerasi radikal hidroksil dan radikal peroksil menjadi lebih stabil dan radikal fenoksil yang terbentuk (flavonoid- O^*) bersifat kurang reaktif.

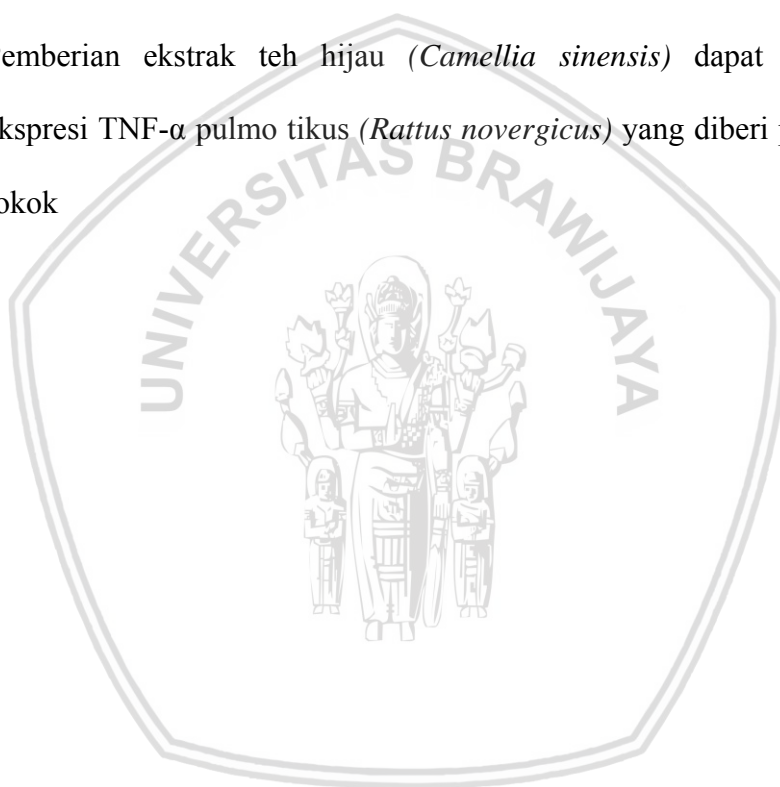
Katekin dengan grup hidroksil bebas mampu bereaksi sebagai akseptor radikal bebas dan juga menghambat pembentukan radikal. Katekin memiliki grup hidroksil yang berperan untuk menangkap ion logam. Komponen fenol atau polifenol memiliki sifat sebagai antioksidan primer, yaitu dapat mendonorkan elektron dan mengikat logam.

Pemberian teh hijau akan menaikkan antioksidan di dalam tubuh, sehingga terjadi penurunan radikal bebas, dan mengakibatkan NF- κ B dan fosforilasi I κ B tidak teraktivasi sehingga terjadi penurunan TNF- α oleh makrofag. Penurunan TNF- α dapat menurunkan terjadinya inflamasi dan kerusakan jaringan. Aktivitas antioksidan pada Teh Hijau (*Camellia sinensis*) sangat efektif untuk menangkal radikal bebas dan mencegah terjadinya stress oksidatif akibat paparan asap rokok.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) dapat menurunkan jumlah sel radang pada histopatologi pulmo tikus (*Rattus novergicus*) yang diberi paparan asap rokok.
2. Pemberian ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) dapat menurunkan ekspresi TNF- α pulmo tikus (*Rattus novergicus*) yang diberi paparan asap rokok



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret-April 2018 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Flowcitometri TNF- α dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Brawijaya. Pembuatan ekstrak daun Teh hijau dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Sampel Penelitian

Hewan model yang digunakan di dalam penelitian ini adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Hewan coba diaklimasi selama 7 hari dengan pemberian ransum. Penelitian bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan estimasi sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$P(n-1) \geq 15$$

$$P(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan perhitungan diatas, yaitu jumlah kelompok perlakuan disimbolkan dengan huruf p sedangkan jumlah ulangan yang diperlukan

disimbolkan huruf n. dari perhitungan diatas, lima jenis kelompok perlakuan memerlukan jumlah ulangan minimal dalam setiap kelompok yaitu empat kali.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap dan bersifat eksperimental. Pembagian hewan coba sebagai berikut :

- K (-) : Tikus tidak diberikan paparan asap rokok dan ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*)
- K (+) : Tikus diberi paparan asap rokok 3 batang/hari selama 14 hari pada hari ke 15 sampai hari ke 28 dan tanpa diberikan ekstrak teh hijau.
- P1 : Tikus diberikan ekstrak teh hijau sebanyak 6,25 mg pada hari ke 8 sampai hari 28 dan diberi paparan asap rokok 3 batang perhari pada hari ke 15 sampai hari ke 28
- P2 : Tikus diberikan ekstrak teh hijau sebanyak 9,375 mg pada hari ke 8 sampai hari 28 dan diberi paparan asap rokok 3 batang per hari pada hari ke 15 sampai hari ke 28
- P3 : Tikus diberikan ekstrak teh hijau sebanyak 12,5 mg pada hari ke 8 sampai hari 28 dan diberi paparan asap rokok 3 batang per hari pada hari ke 15 sampai hari ke 28

Tabel 4.1 Rancangan kelompok penelitian ini.

Variabel yang diamati Jumlah sel radang dan TNF- α pulmo	Ulangan			
	1	2	3	4
Kelompok kontrol negatif (K-)				
Kelompok kontrol positif (K+)				
Kelompok preventif kelompok I 6,25 mg (P1)				
Kelompok preventif kelompok II 9,375 mg (P2)				
Kelompok preventif kelompok III 12,5 mg (P3)				

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang dapat diamati dalam penelitian ini, yakni:

Variabel bebas : Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis Folium*),
paparan asap rokok

Variabel tergantung : Jumlah sel radang, gambaran histopatologi pulmo,
dan ekspresi TNF- α

Variabel kontrol : Jenis kelamin tikus, berat badan tikus, umur tikus, dan
pakan tikus

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah kandang berukuran 37
 \times 26 \times 12,5 cm yang ditutup dengan kawat untuk tempat tinggal tikus,
smoking pump, botol air minum, botol obat, seperangkat alat bedah, cawan
petri, labu ukur, mortar, spatula, pipet tetes, gelas ukur, tabung reaksi, corong
gelas, tabung polipropilen, mikro pipet, gunting, spuit, objek glass, cover
glass, mikroskop cahaya, timbangan, sonde.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus
novergicus*) jantan galur Wistar dengan berat rata-rata 250 gram sebanyak 25
ekor, rokok kretek, teh hijau (*Camellia sinensis*) yang diperoleh daun kebun

Teh Singosari, Malang, pakan tikus, sekam padi, etanol 70%, akuades, formalin 10%, alkohol 70%, pewarna hematoksin eosin (HE), methanol, akuades, larutan alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95%, formalin 10%, PBS, alkohol absolut, xylol I, II, dan III, pewarna hematoksin-eosin (HE), antibodi sekunder, xylol, PBS, H₂O₂, BSA.

4.6 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan percobaan
2. Pembuatan ekstrak daun teh hijau
3. Uji fitokimia ekstrak daun teh hijau
4. Pemberian ekstrak daun teh hijau
5. Paparan asap rokok
6. Pengambilan organ pulmo
7. Pembuatan dan perhitungan sel radang preparat histopatologi pulmo
8. Pengujian Flowcitometri untuk melihat ekspresi TNF- α

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus diaklimatisasi selama tujuh hari untuk beradaptasi dengan lingkungan. Tikus diberikan pakan ransum dan minum yang sama. Tikus dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yang terdiri dari empat ekor tikus pada setiap kelompok. Tikus dipelihara di dalam kandang berukuran 37 × 26 × 12,5 cm dengan suhu ruang 22-24°C.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau

Pembuatan ekstrak teh hijau dilakukan dengan metode ekstraksi, yaitu maserasi. Daun teh hijau dicuci dengan air mengalir, dipotong kecil-kecil, diangin-anginkan, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 45°C selama 2 jam. Daun teh kering dihaluskan sampai menjadi serbuk seberat 100 gram. Serbuk daun teh hijau dimasukkan dalam maserator, etanol 70% ditambahkan sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 kali simplisia yakni 900 mL, dan dilakukan pengadukan sampai homogen. Hasil campuran tersebut dibiarkan termaserasi selama 48 jam dalam maserator tertutup dengan pengadukan setiap hari. Pelarut dibiarkan terpisah dengan zat aktif, sehingga akan didapatkan hasil ekstraksi kira-kira 1/5 dari bahan alam kering, dan hasil ekstraksi dapat disimpan didalam *freezer*. Umumnya maserasi merupakan proses ekstraksi paling sederhana dan menghemat waktu (Rohdiana dkk., 2012).

4.7.3 Uji Antioksidan Larutan Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau

Uji aktivitas antioksidan daun teh hijau menggunakan metode uji DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Pada metode ini, antioksidan bereaksi dengan radikal bebas DPPH dengan cara mendonorkan atom hydrogen yang menyebabkan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Intensitas warna diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm. Pengujian dilakukan dengan cara ekstrak daun teh hijau hasil dari evaporasi dilarutkan dengan metanol, kemudian ekstrak direaksikan dengan DPPH 0,1 mM dengan perbandingan volume 1 : 1, diinkubasi selama 30 menit, kemudian diukur absorbansi sampel dengan

spektrofotometer. Aktivitas antioksidan dinyatakan secara kuantitatif dengan IC50. IC50 adalah konsentrasi larutan uji yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (Jaya, dkk., 2009). Kekuatan antioksidan dibedakan menjadi menjadi empat, yaitu kelompok sangat kuat jika nilai IC50 kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, kelompok kuat IC50 antara 50-100 $\mu\text{g/mL}$, kelompok sedang IC50 antara 100-200 $\mu\text{g/mL}$, dan kelompok lemah IC50 lebih dari 200 $\mu\text{g/mL}$. Hasil pengujian DPPH ekstrak daun teh hijau pada penelitian ini didapatkan hasil IC50 sebesar 49,45 $\mu\text{g/mL}$ (**Lampiran 2**), yang termasuk dalam kategori yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat (Sudaryat. dkk., 2015)

4.7.4 Pemberian Ekstrak Daun Teh Hijau

Pemberian ekstrak daun teh hijau dengan menggunakan sonde. Cara pemberian dengan memegang bagian leher belakang dengan menggunakan tangan kiri, kemudian tangan kanan memegang alat sonde yang berisi ekstrak teh hijau dan dimasukkan kira-kira sampai lambung (Ngatidjan, 2006). Dengan pemberian menggunakan sonde ini memastikan apabila ekstrak masuk seluruhnya dan langsung ke dalam lambung. Bentuk sediaan yang berupa cairan, maka akan memudahkan penyerapan ekstrak ke dalam tubuh.

4.7.5 Paparan Asap Rokok

Rokok yang dipakai yaitu jenis rokok tanpa filter bermerk Trubus dari Tulungagung. Pemberian paparan asap rokok dengan menggunakan kandang dalam *smoking chamber* yang dilengkapi dengan ventilasi udara, dua buah *air pump*, dan tempat pembakaran rokok. Asap rokok dipaparkan dengan dosis tiga batang rokok perhari selama 14 hari (Adyttia, dkk., 2014). Jumlah rokok

yang digunakan didasarkan pada nilai LD₅₀ nikotin untuk tikus yakni 50 mg/kgBB (Adyitia, dkk., 2014).

4.7.6 Pengambilan Organ Pulmo

Dilakukan euthanasi pada tikus, kemudian diposisikan rebah dorsal di atas alas bedah dan kaki difiksasi dengan *pin*. Alkohol 70% atau desinfektan lainnya dibasahi di bagian permukaan ventral tubuh agar jaringan tidak terkontaminasi oleh rambut tikus (Suckow, *et al.*, 2012). Pada bagian caudal midline diinsisi kulit menuju cranial dari organ genital eksternal sampai symphysis mandibula. Kulit dan bagian subkutan diinsisi sampai mengarah ke lateral dan difiksasi dengan *pin* agar organ visceral tidak terkontaminasi oleh rambut tikus. Cavum abdomen dibuka dengan melakukan insisi medial dinding abdomen pada linea alba dari symphysis pubis sampai processus xyphoideus. Potong bagian diafragma dan os costae, kemudian organ pulmo diisolasi secara perlahan (Suckow, *et al.*, 2012).

4.7.7 Pembuatan Preparat Histopatologi dan Perhitungan Sel Radang Pulmo

Organ pulmo dibersihkan dengan menggunakan aquades dan dimasukkan ke dalam pot organ berisi formalin 10%. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan pengecatan hematoxilin dan eosin (HE).

Pulmo yang telah direndam dalam formalin 10% dipotong hingga berukuran (10-15) mm x (10-15) mm x 5 mm. selanjutnya akan dilakukan proses dehidrasi, yaitu untuk mengeluarkan air dari jaringan kemudian diisi

parafin. Proses dehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90%, dan 95%. Tahap penjernihan dilakukan mulai jaringan dari alkohol absolut III ke larutan penjernihan yaitu xylol I, xylol II, dan xylol III. Kemudian dilakukan infiltrasi dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator dengan suhu 58-60°C (Carneiro, 2007)

Sampel dipotong dengan menggunakan mikrotom hingga didapatkan irisan 3-5 μm . Selanjutnya dilakukan proses pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Irisan preparat pada gelas objek direndam berturut-turut ke dalam xylol (2 menit), xylol (2 menit), etanol absolut (1 menit), etanol absolut (1 menit), etanol 95% (1 menit), etanol 95% (1 menit). Setelah itu, dilakukan pencucian dengan air mengalir selama 10-15 menit. Selanjutnya direndam dalam larutan *hypo* tiga menit dan dibilas dengan air mengalir 10 menit. Kemudian direndam dalam larutan *mayer's haematoxylin* selama 5 menit, selanjutnya dibilas dengan air mengalir kembali selama 20 menit. Preparat kemudian direndam bertahap ke dalam larutan eosin (5 detik – 2 menit), etanol 95% (2 menit), etanol 95% (2 menit), etanol 95% (2 menit), xylol (2 menit), xylol (2 menit), xylol (2 menit). Langkah selanjutnya dilakukan tahap *mountung* untuk menutup preparat dengan *cover slip* dan direkatkan dengan entellan neu (Sulistyowati, dkk., 2012). Sampel ditetesi dengan entellan neu dan ditutupi dengan *cover glass* dengan hati-hati sehingga tidak menimbulkan gelembung, kemudian dikeringkan di dalam oven 45°C. Sampel yang sudah kering siap diamati dibawah mikroskop cahaya, kemudian dilakukan pemetretan dengan

menggunakan kamera digital, dan perhitungan sel radang dilakukan pada lima lapang pandang. (Lubis, dkk., 2014).

4.7.8 Pembuatan dan Analisis Ekspresi TNF- α

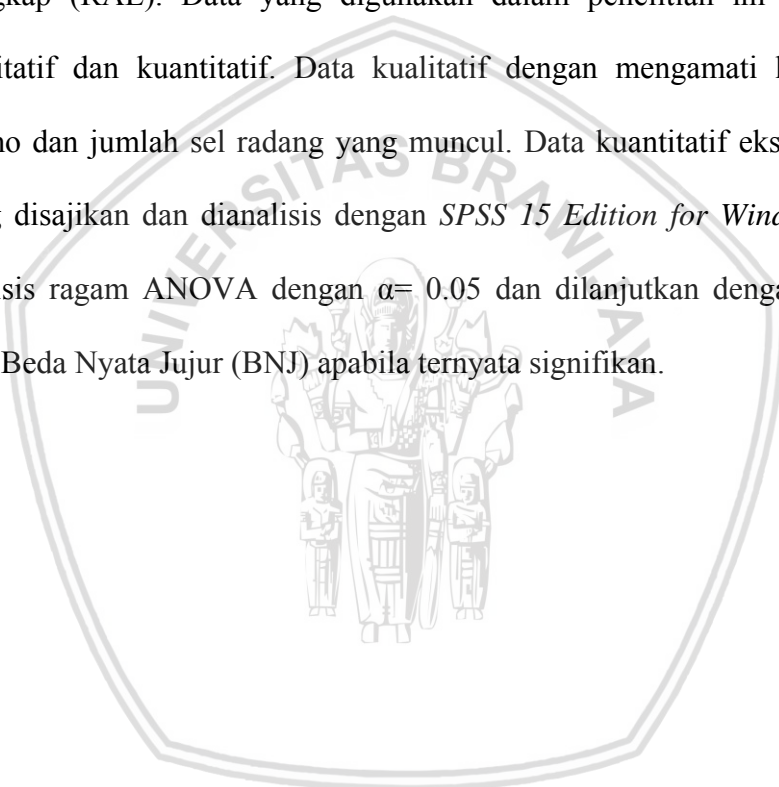
Pengukuran Ekspresi TNF- α diawali pengambilan sampel pulmo dengan. Sampel disimpan pada pot organ yang berisi *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan dimasukkan pada ice box. Sampel selanjutnya dibersihkan menggunakan PBS sebanyak dua kali, setelah itu diletakan pada cawan petri yang berisi 5 mL PBS, digerus dengan bagian pangkal spuit kemudian dilakukan homogenisasi dan dilakukan suspensi menggunakan PBS kembali. Beberapa sel yang diperoleh dari hasil isolasi difilter menggunakan *wire*. Berikutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm, pada suhu 20°C selama 5 menit. Hasil supernatan dibuang dan pelletnya di fiksasi dengan 100 μ L *cytofix/cytoferm* 10x dan diinkubasi kembali selama 20 menit. Larutan *cytofix/cytoferm* memiliki fungsi memfiksasi dan menciptakan permeabilitas sel yang diperlukan untuk pewarnaan sitokin intraselular menggunakan antibodi anti-sitokin yang sudah terkonjugasi. Kemudian sampel dicuci dengan 1 ml *wash buffer* 10x. Supernatan yang terbentuk selanjutnya dibuang dan ditambahkan 50- 100 μ L kemudian ditambahkan antibodi untuk proses selanjutnya.

Kemudian data dari *flowcytometry* dilakukan analisis menggunakan *software BD cellquest ProTM*. Selanjutnya dilakukan koneksi dengan komputer dan flowcytometer disetting dengan keadaan acquiring serta dilakukan setting sesuai parameter yang akan dianalisis. Selanjutnya dipilih acquire dan

flowcytometer akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi. Hasil yang diperoleh selanjutnya diolah dengan *BD cellquest ProTM* (Mufidah, 2013).

4.8 Analisis Data

Penelitian ini merupakan penelitian murni dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif dengan mengamati histopatologi pulmo dan jumlah sel radang yang muncul. Data kuantitatif ekspresi TNF- α yang disajikan dan dianalisis dengan *SPSS 15 Edition for Windows* dengan analisis ragam ANOVA dengan $\alpha = 0.05$ dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) apabila ternyata signifikan.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Merokok merupakan kegiatan yang berbahaya bagi lingkungan dan kesehatan karena mengandung sekitar 4700 komponen kimia dan 200 diantaranya merupakan zat yang berbahaya bagi kesehatan. Komponen kimia rokok yang berbahaya diantaranya adalah radikal bebas dan oksidan dalam konsentrasi yang tinggi (Rahimah, dkk., 2010). Asap rokok merupakan radikal bebas yang berasal dari sumber eksogenus, yang memiliki reaktivitas yang tinggi. Radikal bebas dari asap rokok cenderung menarik elektron dari molekul lain yang berpasangan. Radikal bebas bekerja dengan merusak molekul yang memiliki elektron dan ditarik oleh radikal bebas sehingga mengakibatkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel, dan bahkan kematian (Fitria, dkk., 2015).

Radikal bebas yang ada di dalam asap rokok dapat menyebabkan stres oksidatif di dalam pulmo. Keadaan ini menyebabkan luka dan mengaktifasi mekanisme molekular untuk inisiasi inflamasi karena pulmo merupakan organ yang berinteraksi langsung dengan asap rokok, sehingga pulmo memiliki resiko yang paling tinggi dalam mengalami kerusakan (Rahimah, 2010). Pencegahan terjadinya stress oksidatif dibutuhkan antioksidan eksogen (Musrifah, 2015). Teh hijau merupakan salah satu sumber antioksidan eksogen, yang diberikan sebagai tindakan preventif. Uji DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) pada **Lampiran 2** didapatkan hasil bahwa ekstrak daun teh hijau (*Camelia sinensis*) yang digunakan memiliki nilai IC₅₀ sebesar 49,45 µg/mL sehingga dapat digolongkan sebagai antioksidan kuat (Sudaryat, dkk. 2015).

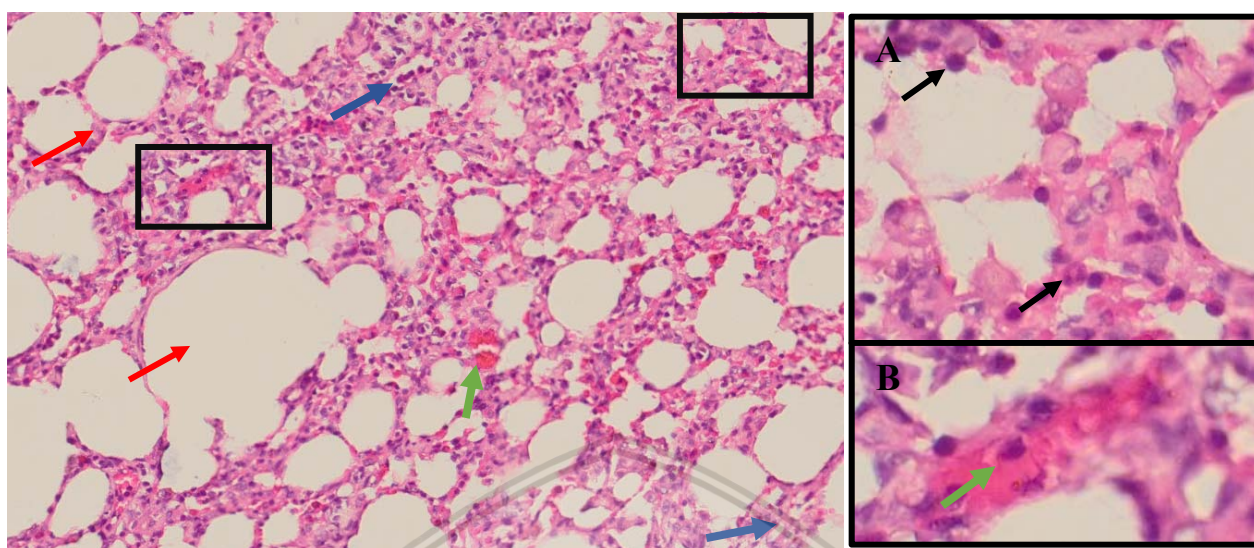
5.1 Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap Jumlah Sel Radang pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) hasil Paparan Asap Rokok.

Perhitungan sel radang pada pulmo tikus dilakukan dengan menggunakan pembuatan preparat histopatologi. Pembuatan histopatologi pulmo dengan menggunakan pewarnaan HE (*Haematoxylin Eosin*). Preparat pulmo dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x dan 400x, kemudian dihitung jumlah sel radangnya sebanyak lima lapang pandang.



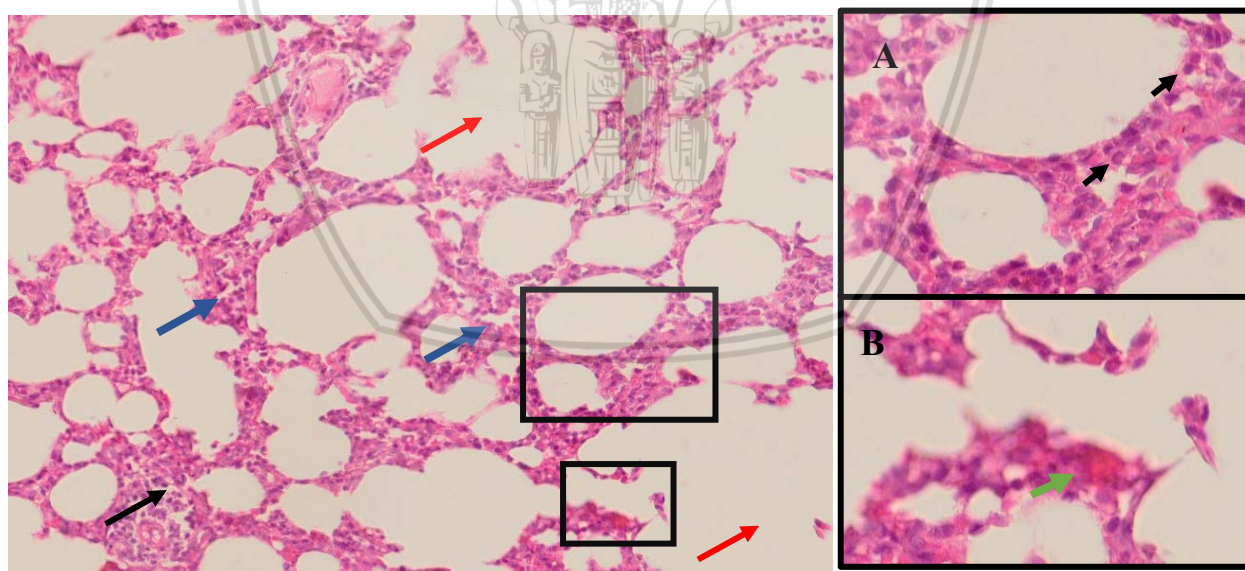
Gambar 5.1.A Histopatologi pulmo tikus (*Rattus novergicus*) Kontrol (-) dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x).

Keterangan : Tikus kontrol negatif, **B**: Tikus kontrol positif, **C**: Tikus terapi preventif 1 (25 mg/kg BB), **D**: Tikus terapi preventif 2 (37,5 mg/kg BB), **E**: Tikus terapi preventif 3 (50 mg/kg BB)



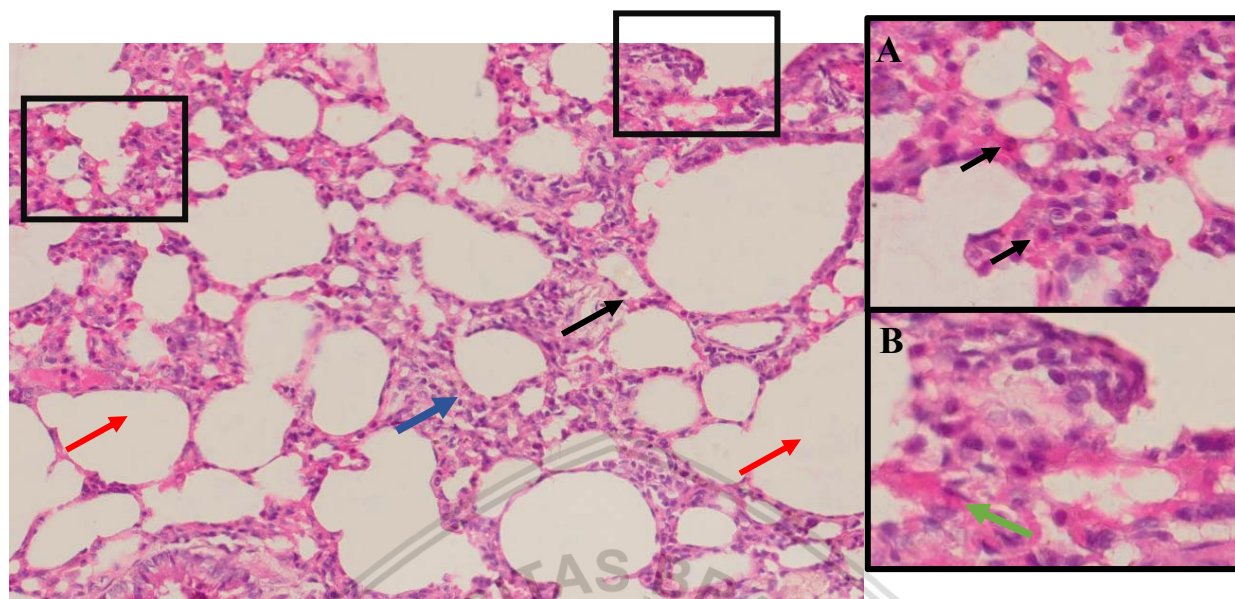
Gambar 5.1.B Histopatologi pulmo tikus (*Rattus norvegicus*) Kontrol (+) dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x dan 400x).

Keterangan : ➔ : Pelebaran, ➔ : Atelektasis, ➔ : Infiltrasi sel radang, ➔ : Hemoragi alveolus, A: sel radang (Perbesaran 400x), B: Hemoragi alveolus (Perbesaran 400x)



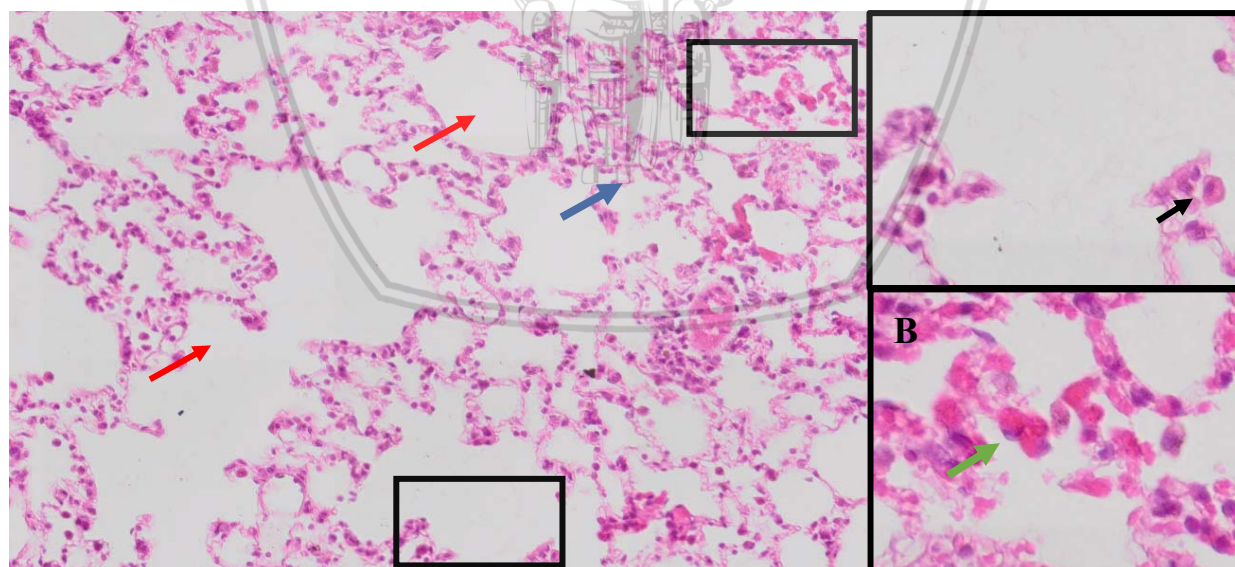
Gambar 5.1.C Histopatologi pulmo tikus (*Rattus norvegicus*) Preventif 1 dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x dan 400x).

Keterangan : Tikus terapi preventif 1 (25 mg/kg BB), ➔ : Pelebaran, ➔ : Atelektasis, ➔ : Infiltrasi sel radang, ➔ : Hemoragi alveolus, A : sel radang (Perbesaran 400x). B : Hemoragi alveolus (Perbesaran 400x),



Gambar 5.1.D Histopatologi pulmo tikus (*Rattus norvegicus*) Preventif 2 dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x dan 400x).

Keterangan : Tikus terapi preventif 2 (37,5 mg/kg BB), ➔ : Pelebaran, ➔ : Atektasis, ➔ : Infiltrasi sel radang, ➔ : Hemoragi alveolus, A : sel radang (Perbesaran 400x), B : Hemoragi alveolus (Perbesaran 400x)



Gambar 5.1.E Histopatologi pulmo tikus (*Rattus norvegicus*) Preventif 3 dengan pewarnaan HE (Perbesaran 100x dan 400x).

Keterangan : Tikus terapi preventif 3 (50 mg/kg BB), ➔ : Pelebaran, ➔ : Atektasis, ➔ : Infiltrasi sel radang, ➔ : Hemoragi alveolus, A : sel radang (Perbesaran 400x), B : Hemoragi alveolus (Perbesaran 400x)

Pada hasil pengamatan mikroskopik histopatologi jaringan pulmo kelompok (-) (**Gambar 5.1.A**) memperlihatkan sel radang yang rendah tanpa inflamasi dan kondisi patologis lain. Lumen alveolus tidak mengalami pelebaran atau penyempitan. Kondisi ini menandakan bahwa jaringan pulmo masih dalam keadaan normal. Sedangkan pada pengamatan histopatologi Kontrol (+) (**Gambar 5.1.B**) tampak adanya inflamasi, atelektasis dan hemoragi alveolus. Kondisi ini disebabkan oleh paparan asap rokok yang dapat meningkatkan radikal bebas di dalam pulmo, sehingga pulmo mengalami stress oksidatif dan memicu kerusakan jaringan (Rahimah, 2010). Inflamasi terjadi karena pelepasan berbagai mediator yang berasal dari jaringan rusak, sel mast, leukosit, dan komplemen. Keadaan inflamasi ditandai dengan adanya akumulasi sel radang (Soesilo, 2012). Reaksi inflamasi akut yang terjadi pada pulmo yang dipapar asap rokok dapat mengakibatkan pembuluh darah pada septa alveoli mengalami peningkatan permeabilitas dan vasodilatasi untuk mengaktifkan sel-sel radang kemudian bermigrasi keluar dari vaskuler untuk melakukan fagositosis ditandai terjadi penebalan septa interalveolaris (Kardena, dkk., 2011). Oleh karena itu, dibutuhkan antioksidan seperti polifenol (katekin) dalam teh hijau (*Camellia sinensis*) yang berperan dalam meredam radikal bebas, dimana radikal bebas merupakan penyebab terjadinya stres oksidatif (Kusumastuty dkk., 2014).

Pengamatan yang dilakukan pada preventif 1 (**Gambar 5.1.C**), tampak adanya kerusakan pada histopatologi pulmo yang ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang pada septa interalveolaris, atelektasis, dan sedikit

hemoragi alveolus. Kondisi atelektasis terjadi karena udara yang terdapat dalam alveoli diserap kembali dalam pembuluh darah, namun udara dari luar tidak dapat masuk karena adanya obstruksi bronkus akibat hiperresponsif dari bronkus yang menyebabkan penyempitan dan penyumbatan oleh sekret (Meiyanti dan Mulia, 2000). Keadaan ini menyebabkan bagian alveoli yang mengalami obstruksi menyempit dan bagian lainnya mengembang secara berlebihan (Muttaqin, 2008). Pada preventif 2 (**Gambar 5.1.C**), masih terdapat hemoragi alveolus, inflamasi, dan kondisi atelektasis yang lebih sedikit dibandingkan pada preventif 1. Pada preventif 3 (**Gambar 5.1.E**), kondisi histopatologi pulmo hampir sama dengan kontrol (-). Terdapat sedikit hemoragi alveolus, sedikit kondisi atelektasis, dan tidak ditemukan penebalan septa interalveolaris akibat infiltrasi sel radang. Dengan kondisi dari preventif (1,2, dan 3) yang secara berurutan mengalami perbaikan, maka dapat disimpulkan bahwa teh hijau mampu menangkal radikal bebas di dalam tubuh.

Dari pengamatan histopatologi di atas, dilanjutkan dengan menghitung jumlah sel radang yang dilakukan untuk mengetahui jenis-jenis sel radang yang muncul pada inflamasi akibat paparan asap rokok. Sel radang dihitung dalam lima lapang pandang dan dibedakan berdasarkan morfologi sel yang terlihat. Daftar jumlah sel radang dapat dilihat pada **Tabel 5.1**

Tabel 5.1 Jumlah Rerata Sel Radang Pulmo Tikus Pada Kelompok Perlakuan Pada Lampiran Data Lima Lapang Pandang

Jenis Sel Radang	Kelompok Perlakuan				
	K(-)	K(+)	P1	P2	P3
Makrofag	13	23	21	18	10
Neutrofil	8	20	17	14	10
Eosinofil	0	0	0	0	0
Basofil	0	0	0	0	0
Limfosit	9	16	13	11	9
Monosit	0	0	0	0	0

Inflamasi ditandai dengan adanya infiltrasi sel radang. Jenis sel radang terdiri dari mononuklear dan polimorfonuklear. Mononuklear terdiri dari monosit dan limfosit, sedangkan polimorfonuklear terdiri dari neutrofil, basofil, dan eosinofil. Sel neutrophil memiliki dua granula azurofilik yang mengandung enzyme lisozom, peroksidase, dan granula spesifik yang mengandung fosfatase alkali dan zat bakterisidal fagositin, serta serta menghancurkan jaringan yang rusak (Effendi, 2003). Sel eusinofil memiliki peran utama untuk melawan parasit, alergi, dan kerusakan jaringan. Eosinophil sebagai pertahanan utama melawan parasite dapat mengeluarkan granula dan memfagositosis debris dari parasite (Jatmiko, 2015). Limfosit memiliki peran sebagai respon kekebalan seluler dengan membentuk sel yang reaktif antigen dan dapat meredam radikal bebas (D'Hiru, 2013). Monosit

bersikulasi di dalam darah selama 1-3 hari, kemudian bermigrasi ke dalam jaringan tubuh menjadi makrofag (Peckham, 2014).

Dari **Tabel 5.1** dapat dilihat yaitu sel radang yang muncul pada inflamasi pulmo adalah makrofag, neutrophil, dan limfosit. Hal ini menunjukkan bahwa inflamasi yang terjadi yaitu inflamasi akut (Yulida, dkk., 2013). Paparan asap rokok yang diberikan dalam dua minggu menyebabkan kenaikan leukosit yang menjadi respon alami tubuh akibat masuknya benda asing dan menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan. Asap rokok yang masuk ke dalam paru-paru dapat meningkatkan pelepasan sitokin proinflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, dan IL-8. Peningkatan kadar sitokin pro inflamasi tersebut akan meningkatkan pembentukan leukosit (neutrophil dan limfosit) pada histopatologi pulmo (Permatasari dan Probosari, 2015).

Pada **Tabel 5.1** terlihat kontrol (-) memiliki jumlah yang paling rendah dibandingkan kontrol (+) dan preventif (1 dan 2). Hal ini disebabkan pada kontrol (-) pulmo tidak terkena paparan asap rokok. Ditemukannya sel radang pada kontrol (-) pulmo, merupakan keadaan normal salah satunya berperan dalam apoptosis sel (Widjajanto, 2005). Berbeda dengan kontrol (+), jumlah sel radang (makrofag, neutrofil, dan limfosit) meningkat. Pada kontrol (+), inflamasi terjadi karena paparan asap rokok menyebabkan stress oksidatif sehingga dapat merusak sel dan mengakibatkan inflamasi kemudian terjadi penumpukan sel radang pada organ pulmo.

Pada kelompok preventif, tikus diberikan teh hijau sebagai antioksidan eksternal, sehingga tampak pada **Tabel 5.1** jumlah sel radang pada kelompok preventif (1,2, dan 3) mengalami penurunan. Penurunan jumlah sel radang terjadi karena antioksidan di dalam teh hijau mampu menangkal radikal bebas sehingga mencegah stress oksidatif dan kerusakan sel. Penurunan jumlah sel radang sebanding dengan pemberian dosis. Pada preventif 1 jumlah sel radang mengalami penurunan dari pada kontrol (+) dan jumlah sel radang pada preventif 2 mengalami penurunan dibanding preventif 1. Diantara ketiga dosis yang diberikan, dosis preventif 3 merupakan dosis paling efektif, karena jumlah sel radang yang muncul paling rendah dibandingkan kelompok preventif 1 dan preventif 2, dan hampir sama dengan kontrol (-).

5.2 Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap TNF- α pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) hasil Paparan Asap Rokok

Ekspresi TNF- α pada pulmo tikus diuji dengan menggunakan Flowcitometri. Hasil ekspresi TNF- α pulmo pada kelompok tikus perlakuan selanjutnya dilakukan analisa statistik menggunakan *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 15 dengan uji *one way* ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey*. Hasil uji statistik dapat dilihat pada **Tabel 5.2**

Tabel 5.2 Rata-rata ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) pada pulmo tikus kontrol, tikus yang diberi paparan asap rokok, dan tikus yang diberi preventif ekstrak daun teh hijau (*Camelia sinensis*).

Kelompok	Rata-rata TNF- α % \pm SD
Kontrol (-)	22,82 \pm 2,34 ^b
Kontrol (+)	41,29 \pm 1,93 ^e
Preventif 1 (25 mg/kg BB)	36,05 \pm 2,09 ^d
Preventif 2 (37.5 mg/kg BB)	27,69 \pm 0,51 ^c
Preventif 3 (50 mg/kg BB)	12,66 \pm 1,06 ^a

Keterangan : notasi a,b,c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Pada **Tabel 5.2** maka dapat dilihat pada kontrol (-) atau kontrol sehat kadar TNF- α rendah dibandingkan kelompok perlakuan lain, yaitu 22,82 \pm 2,34^b%. Dalam kondisi sehat, TNF- α normal ada di dalam organ, karena TNF- α dapat dihasilkan oleh makrofag yang secara normal tersebar luas di jaringan yang berperan dalam fagositosis sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis (Caroline dan Sudiono. 2015). Nilai TNF- α pada kontrol (-) berbeda signifikan dibandingkan nilai TNF- α pada kontrol (+) yang jauh lebih tinggi, yaitu mencapai 41,29 \pm 1,93^e. Tingginya kadar TNF- α disebabkan adanya paparan asap rokok yang masuk ke dalam tubuh. Paparan asap rokok mengandung oksidan yang tinggi dan mampu membentuk senyawa radikal bebas yang baru serta dapat meningkatkan reaktivitas ROS di dalam tubuh (Rahmad, dkk., 2015). Elektron tidak berpasangan pada radikal bebas sangat reaktif sehingga dapat menyerang DNA, protein, dan lipid (Fitria, dkk.,

2015). Kerusakan yang terjadi pada sel akan menyebabkan terjadinya inflamasi (Darlina, dkk., 2015).

Nilai preventif (1,2, dan 3) berbeda signifikan dengan perlakuan kontrol (+). Hal ini karena pemberian ekstrak teh hijau sebagai tindakan preventif memiliki kandungan mineral seperti, tembaga (Cu), seng (Zn), dan mangan (Mn) yang memiliki peran dapat meningkatkan efektivitas antioksidan endogen yang sudah ada di dalam tubuh (Astuti, 2008). Grup hidroksil pada cincin B senyawa flavonoid (katekin) di dalam teh hijau diketahui dapat menstabilkan radikal bebas dengan mendonorkan ion hidrogen (Astuti, 2008). Kekuatan antioksidan teh hijau terbukti mampu menangkal radikal bebas yang berasal dari rokok sehingga mencegah terjadinya inflamasi yang dapat dilihat dari kadar TNF- α . **Tabel 5.2.** Ekstrak teh hijau dengan dosis bertingkat mampu menurunkan ekspresi TNF- α dibandingkan dengan kontrol (+).

Penurunan kadar TNF- α pada perlakuan preventif sebanding dengan peningkatan dosis teh hijau. Nilai TNF- α pada preventif 1, yaitu $36,05 \pm 2,09\%$ berbeda signifikan dengan preventif 2 yang memiliki nilai yang lebih rendah. Pada preventif 2 memiliki nilai $27,69 \pm 0,51\%$ yang berbeda signifikan dibandingkan preventif 3 yang nilainya lebih rendah. Hal ini membuktikan bahwa pada dosis perlakuan 3 merupakan dosis paling efektif dalam menurunkan kadar radikal bebas dari rokok.

Dilihat dari **Tabel 5.2** terlihat apabila nilai ekspresi TNF- α perlakuan 3 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (-). Tingginya kadar TNF- α pada

kontrol (-) dibandingkan dengan preventif (3) hal ini dapat disebabkan oleh ROS yang secara normal ada di dalam tubuh hasil dari reaksi rantai penafasan di dalam mitokondria dari aktivasi makrofag serta senyawa radikal oksigen endogen lain (Permatasari dan Probosari, 2015). Sehingga pada kondisi kontrol (-) ROS tetap ada di dalam jaringan menjadi penyebab masih ditemukannya sel leukosit.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian preventif ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis Folium*) pada tikus hasil paparan asap rokok dapat menurunkan jumlah sel radang dilihat dari histopatologi organ pulmonal dibandingkan kontrol (+).
2. Pemberian preventif ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis Folium*) pada tikus hasil paparan radikal bebas asap rokok mampu menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pulmonal dibandingkan kontrol (+).

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat dilakukan yakni:

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk menghasilkan data yang lebih lengkap untuk melihat efektivitas dan efek samping dalam penggunaan teh hijau sebagai tindakan preventif pencegahan berbagai penyakit akibat asap rokok.

DAFTAR PUSTAKA

- Adyitia, A., E.K. Untari., dan S. Wahdaningsih. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Buas-Buas (*Premna cordifolia*. LINN) terhadap Kadar MDA Tikus Wistar Jantan Pasca Paparan Asap Rokok. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 1(2) : 35-40.
- Anjarsari, I.R.D. 2016. Katekin Teh Indonesia: Prospek dan Manfaatnya. *Jurnal Kultivasi*, 15(2) : 100-104.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2).
- Bacha, J. W., and L. MBacha. 2012. *Third Edition Color Atlas Of Veterinary Histology*. UK. Wiley-Blackwell
- Baratawidjaja, K.G., dan I. Rengganis. 2014. *Imunologi Dasar Edisi Ke-11 (Cetakan ke-2)*. Jakarta. FKUI
- Carneiro. J., and Kelley. 2007. *Histologi Dasar. Edisi ke-5. Tambayang J., penerjemah. Terjemahan dari Basic Histology*. Jakarta:EGC
- Caroline, dan J. Sudiono. 2015. Peran Monosit (Makrofag) Pada Proses Angiogenesis dan Fibrosis. *Seminar Nasional Cendekiawan*.
- Darlina, Tur, R., dan Teja, K. 2015. Respon Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF-A) dalam Darah dan Limpa Mencit yang Divaksinasi dengan P.berghei Radiasi. *Pusat Sains dan Teknologi Akselerator*. Batan
- Diastutik, D. 2016. Proporsi Karakteristik Penyakit Jantung Koroner Pada Perokok Aktif Berdasarkan Karakteristik Merokok. *Jurnal Berkala Epidemiologi* 4(3).
- D'Hiru. 2013. *Live Blood Analysis*. Jakarta. Gramedia Pustaka Utama
- Fitria, R. I. N. K. R. Triandhini, , J. C. Mangimbulude, dan F. F. Karwur. 2013. *Merokok dan Oksidasi DNA*. Sains Medika. 5 (2).
- Garrett, L. D., M. M. Sandra, and J. M. Jennifer.2007. Feline oral squamous cell carcinoma: An overview. *Veterinary Medicine Magazine*.
- Hendrich, H. J. 2012. *The Laboratory Mouse*. Germany. ELSEVIER
- Irawati, L., 2014. Hubungan Tumor Necrosis Factor-Alfa (Tnf-A) dengan Kadar Hemoglobin dan Pemasitemia pada Infeksi Malaria Falciparum. *Jurnal Kesehatan Andalas*. UNAND
- Jatmiko, S. W. 2015. Eosinofil Sebagai Sel Penyaji Antigen. *Bioeksperimen*. 1(1)
- Kardena, I. M., Winaya, O., dan Berata, I. K., 2011. Gambaran Patologi Paru-Paru Pada Anjing Lokal Bali Yang Terinfeksi Penyakit Distemper. *Buletin Veteriner Udayana*. 3(1) : 17-24

- Kumar, V., R. S. Cotran, dan S. L. Robbins. 2013. *Buku Ajar Patologi Robbins Ed. 7*. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perencanaan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga. Surabaya
- Kusuma, D. A., S. Y. Sudarminto, dan S. Wulan. 2005. Studi Kadar Nikotin dan Tar Sembilan Merk Rokok Kretek Filter yang Beredar di Wilayah Kabupaten Nganjuk. *Jurnal Teknologi Pertanian* 5 (3) : 151-155
- Liu, E., and J. Fan. 2017. *Fundamentals of Laboratory Animal Science*. New York. CRC Press
- Lubis, F.A., M. Riau waty., and H. Syawal. 2014. Histology of Liver and Kidney of *Mystus nemurus* that Immerse with *Curcuma xanthorrhiza*, ROXB extract. *Fishery and Marine Science Faculty*, Riau University, Pekanbaru
- Malaeny, C.S., M. Katuuk dan F. Onibala. 2017. Hubungan Riwayat Lama Merokok dan Kadar Kolesterol Total dengan Kejadian Penyakit Jantung Koroner di Poliklinik Jantung RSU Pancaran Kasih GMIM Manado. *e-Journal Keperawatan*, 5(1) : 1-5.
- Manurung, D. N. M., E. Nasrul, dan I. Medison. 2013. Gambaran Jumlah Eosinofil Darah Tepi Penderita Asma Bronkial di Bangsal Paru RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 2(3)
- Martinus, B.A., A. Arel, dan A. Gusman. 2014. Perbandingan Kadar Fenolat Total dan Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis* [L.] O. K.) dari Kayu Aro dengan Produk Teh Hitamnya yang Telah Beredar. *SCIENTIA*, 4(2) : 77-79.
- Meiyanti dan J. L. Mulia. 2000. Perkembangan Patogenesis dan Pengobatan Asma Bronkial. *Jurnal Kedokteran Trisakti*, 19(3)
- Mikrajuddin, A., Saktiyono, dan Lutfi. 2006. *IPA Terpadu SMP dan MTs Jilid 2A untuk Kelas VIII Semester I*. Jakarta. Erlangga
- Mufidah, Z. 2017. Jumlah Relatif Sel Neutrofil (GR-1+) Pada Mencit (*Mus musculus*) Terinfeksi *Staphylococcus aureus* Setelah Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Medical and Health Science Journal*, 1(1) : 25-31
- Muliarta, I.K.G., E. Sriwahyuni dan Yuliawati. 2009. Pemberian Kombinasi Vitamin C dan E Peroral Memperbaiki Kerusakan Hepar Akibat Paparan Rokok Kretek Sub Kronik. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 25(1) : 23-25.
- Musarofah. 2015. *Tumbuhan Antioksidan*. Remaja Rosdakarya. Bandung, 2-44.
- Muttaqin, A. 2008. *Buku Ajar Asuh Keperawatan Klien dengan Gangguan Sistem Pernafasan*. Jakarta. Salemba Medika

- Ngatidjan. 2006. Metode Laboratorium dalam Toksikologi. Metode Uji Toksisitas.
- Noriani, N. K., I. W. G. Putra, dan , M. Karmaya. 2015. Paparan Asap Rokok Dalam Rumah Terhadap Resiko Peningkatan Kelahiran Bayi Prematur di Kota Denpasar. *Public Health and Preventive Medicine Archive*, 3(1).
- Nururrahmah. 2014. Pengaruh Rokok Terhadap Kesehatan Dan Pembentukan Karakter Manusia, 1(1): 77-84
- Ojo, O. O., F. R.Kabutu, M. Bello, and U. Babayo. 2006. Inhibition of Paracetamol-Induced Oxidative Stress in Rats by Extracts of Lemongrass (*Cymbripogon ciratus*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) In Rats. *African Journal od Biotechnology*, 5(12) : 1227-1232
- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 109. 2012. Pengamanan Bahan Yang Mengandung Zat Adiktif Berupa Produk Tembakau Bagi Kesehatan.
- Permatasari, N. D., dan E. Probosari. 2015. Pengaruh Pemberian Sari Batang Nanas (*Ananas comosus*) Terhadap Total Leukosit Tikus Wistar Yang Diberi Paparan Asap Rokok. *Journal of Nutrition Collage*, 4(2).
- Pitono, J. 2015. Teh Merah (*Camellia sinensis*) Hasil Eksplorasi Di Kabupaten Wonosobo. Bogor. *Pusat Penelitian Dan Pengembangan Perkebunan*.
- Putri, A. P. 2015. Efek Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa Yang Diberi Paparan Asap Rokok. *J MAJORITY*, 4(1).
- Rahimah, S. B., H. S. Sastramihardja, dan T. D. Sitorus. 2010. Efek Antioksidan Jamur Tiram Putih pada Kadar Malondialdehid dan Kepadatan Permukaan Sel Paru Tikus Yang Terpapar Asap Rokok. *MKB*, 42(4)
- Rahmad, L., N. U. Millah, A. Kusumawardani, N. Herliyani, K. Sarwendah, B. Sutrisno, H.Wuryastuti, dan R. Wasito. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) Terhadap Gambaran Histopatologis Paru-paru yang Diinduksi Asap Rokok pada Tikus Putih Wistar. *Jurnal Sain Veteriner* 33(1).
- Rohdiana, D. 2001. Aktivitas Penangkap Radikal Polifenol Dalam Daun Teh. *Majalah Farmasi Indonesia* (1): 52-58.
- Rohdiana, D., A. Firmansyah, A. Setiawati dan N. Yunita. 2012. Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Teh Hijau pada Tikus Putih. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*, 15(1) : 33-35.
- Romich, J. A. 2009. *An Illustrated Guide to Veterinary Medical Terminology*. Third Edition. Delmar. New York. 190.
- Rumiati, F. 2004. Teh Hijau dan Khasiatnya Bagi Penyakit Kanker. *Meditek*, 12(30)

- Subandrate, Safyudin, M. Arifin, dan W. Oktalisa. 2015. Kadar Superoksida Dimutase Mahasiswa Perokok Di Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Sriwijaya. *Jurnal Kedokteran Yasri*. 23 (2) : 076-082
- Subowo. 2009. *Histologi Umum*. Jakarta : CV Sagung Seto
- Suckow, M. A., K. A. Stevens, and R. P. Wilson. 2012. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. USA. ELSEVIER
- Sudaryat, Y., M. Kusmiyati, C. R. Pelangi, A. Rustamsyah, dan D. Rohdiana. 2015. Aktivitas Antioksidan Seduhan Sepuluh Jenis Mutu teh Hitam (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Indonesia. *Jurnal Penelitian teh dan Kina* (18)2: 86-135
- Sugihartini, N., R. Saridewi, U. M. Ramdhani, F. Rahmawanti, S. Yuliani, and V. Sophia. 2017. Anti-Inflammatory Activity of *Camellia sinensis*, I. Extract Cream Combined with Vitamin C as Antioxidant on Croton Oil-induced Inflammation in Male Mice Strain BALB/C. *Traditional Medicine Journal*, 22(2) 73-79.
- Sulistyowati, E., Y. Purnomo, S. Nuri, dan F. Audra. 2013. Pengaruh Diet Sambal Tomat Ranti pada Struktur dan Fungsi Hepar yang di Induksi Tawas. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(3): 156-162
- Supit, I. A., D. H. C. Pangemanan, dan S. R. Murunduh. 2015. Profil Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran UNSRAT Angkatan 2014. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, 3(2)
- Susanti, Y.E., B. Wirjatmadi dan M. Adriani. 2017. Pengaruh Ekstrak Melon terhadap Kadar HbCO pada Tikus Wistar Jantan yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*, 13(3) : 106-109.
- Tabaga, K.D., M.F. Durry dan C. Kairupan. 2015. Efek Seduhan Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap Gambaran Histopatologi Payudara Mencit yang Diinduksi Benzo(a)pyrene. *Jurnal e-Biomedik*, 3(2) : 547-548.
- Towaha, J., dan Balittri. 2013. Kandungan Senyawa Kimia pada Daun Teh (*Camellia sinensis*). *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*, 19(3) : 12-13.
- Tuominen, V. J., S. Ruotoistenmaki., A. Vitanen., M. Jumppanen., and J. Isola. 2010 ImmunoRatio: A Publicly Available Web Application For Quantitative Image Analysis Estrogen Receptor (ER), Progesteron Receptor (PR), And Ki-67. *Biomed Central*. Institute of Medical Technology.
- Ulfah, S. M., M. N. Salim, Nazaruddin, D. Aliza, U. Balqis, dan S. Aisyah. 2016. Gambaran Histopatologis Paru Anjing Lokal (*Canis lupus familiaris*) Yang Menderita Antrakosis. *Jurnal Medika Veterinaria*.

- Ulilalbab, A., B. Wirjatmadi dan M. Adriani. 2015. Ekstrak Kelopak Rosella Merah Mencegah Kenaikan Malondialdehid Tikus Wistar yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 13(2) : 216-218.
- Widjajanto, E. 2005. Peranan Makrofag Pada Proliferasi Diferensiasi dan Apoptosis Pada Proses Hematopoisis (Penelitian Pada Limpa Janin Tikus dan Aspirat Sumsum Tulang Manusia. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 21(1)
- Wulandari, R., dan S. Rahmanisa. 2016. Pengaruh Ekstrak Teh Hijau terhadap Penurunan Berat Badan pada Remaja. *Majority*, 5(2) : 108-109.

